

**IN VITRO HISTAMINFREISETZUNG AUS
MENSCHLICHEN LEUKOZYTEN NACH
PHYSIKALISCHER STIMULATION, INSBESONDERE
NACH UVA - BESTRAHLUNG**

PETRA SPORNRAFT

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. o. Braun-Falco

In vitro Histaminfreisetzung aus menschlichen Leukozyten
nach physikalischer Stimulation, insbesondere nach
UVA-Bestrahlung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Petra Spornraft
aus
München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Ring

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco

2. Prof. Dr. E. Gerlach

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 02. 07. 1987

	1887	1888
1. Einleitung		1
2. Die Bedeutung der Spornraft		2
3. Die Entwicklung der Spornraft		3
4. Die Spornraft in der Gegenwart		4
5. Die Spornraft in der Zukunft		5
6. Die Spornraft in der Vergangenheit		6
7. Die Spornraft in der Gegenwart		7
8. Die Spornraft in der Zukunft		8
9. Die Spornraft in der Vergangenheit		9
10. Die Spornraft in der Gegenwart		10
11. Die Spornraft in der Zukunft		11
12. Die Spornraft in der Vergangenheit		12
13. Die Spornraft in der Gegenwart		13
14. Die Spornraft in der Zukunft		14
15. Die Spornraft in der Vergangenheit		15
16. Die Spornraft in der Gegenwart		16
17. Die Spornraft in der Zukunft		17
18. Die Spornraft in der Vergangenheit		18
19. Die Spornraft in der Gegenwart		19
20. Die Spornraft in der Zukunft		20
21. Die Spornraft in der Vergangenheit		21
22. Die Spornraft in der Gegenwart		22
23. Die Spornraft in der Zukunft		23
24. Die Spornraft in der Vergangenheit		24
25. Die Spornraft in der Gegenwart		25
26. Die Spornraft in der Zukunft		26
27. Die Spornraft in der Vergangenheit		27
28. Die Spornraft in der Gegenwart		28
29. Die Spornraft in der Zukunft		29
30. Die Spornraft in der Vergangenheit		30
31. Die Spornraft in der Gegenwart		31
32. Die Spornraft in der Zukunft		32
33. Die Spornraft in der Vergangenheit		33
34. Die Spornraft in der Gegenwart		34
35. Die Spornraft in der Zukunft		35
36. Die Spornraft in der Vergangenheit		36
37. Die Spornraft in der Gegenwart		37
38. Die Spornraft in der Zukunft		38
39. Die Spornraft in der Vergangenheit		39
40. Die Spornraft in der Gegenwart		40
41. Die Spornraft in der Zukunft		41
42. Die Spornraft in der Vergangenheit		42
43. Die Spornraft in der Gegenwart		43
44. Die Spornraft in der Zukunft		44
45. Die Spornraft in der Vergangenheit		45
46. Die Spornraft in der Gegenwart		46
47. Die Spornraft in der Zukunft		47
48. Die Spornraft in der Vergangenheit		48
49. Die Spornraft in der Gegenwart		49
50. Die Spornraft in der Zukunft		50
51. Die Spornraft in der Vergangenheit		51
52. Die Spornraft in der Gegenwart		52
53. Die Spornraft in der Zukunft		53
54. Die Spornraft in der Vergangenheit		54
55. Die Spornraft in der Gegenwart		55
56. Die Spornraft in der Zukunft		56
57. Die Spornraft in der Vergangenheit		57
58. Die Spornraft in der Gegenwart		58
59. Die Spornraft in der Zukunft		59
60. Die Spornraft in der Vergangenheit		60
61. Die Spornraft in der Gegenwart		61
62. Die Spornraft in der Zukunft		62
63. Die Spornraft in der Vergangenheit		63
64. Die Spornraft in der Gegenwart		64
65. Die Spornraft in der Zukunft		65
66. Die Spornraft in der Vergangenheit		66
67. Die Spornraft in der Gegenwart		67
68. Die Spornraft in der Zukunft		68
69. Die Spornraft in der Vergangenheit		69
70. Die Spornraft in der Gegenwart		70
71. Die Spornraft in der Zukunft		71
72. Die Spornraft in der Vergangenheit		72
73. Die Spornraft in der Gegenwart		73
74. Die Spornraft in der Zukunft		74
75. Die Spornraft in der Vergangenheit		75
76. Die Spornraft in der Gegenwart		76
77. Die Spornraft in der Zukunft		77
78. Die Spornraft in der Vergangenheit		78
79. Die Spornraft in der Gegenwart		79
80. Die Spornraft in der Zukunft		80
81. Die Spornraft in der Vergangenheit		81
82. Die Spornraft in der Gegenwart		82
83. Die Spornraft in der Zukunft		83
84. Die Spornraft in der Vergangenheit		84
85. Die Spornraft in der Gegenwart		85
86. Die Spornraft in der Zukunft		86
87. Die Spornraft in der Vergangenheit		87
88. Die Spornraft in der Gegenwart		88
89. Die Spornraft in der Zukunft		89
90. Die Spornraft in der Vergangenheit		90
91. Die Spornraft in der Gegenwart		91
92. Die Spornraft in der Zukunft		92
93. Die Spornraft in der Vergangenheit		93
94. Die Spornraft in der Gegenwart		94
95. Die Spornraft in der Zukunft		95
96. Die Spornraft in der Vergangenheit		96
97. Die Spornraft in der Gegenwart		97
98. Die Spornraft in der Zukunft		98
99. Die Spornraft in der Vergangenheit		99
100. Die Spornraft in der Gegenwart		100

Meinem Großvater Eduard Spornraft gewidmet

INHALT

Seite

EINLEITUNG	5-11
MATERIAL UND METHODIK	12-52
1. Auswahl der Versuchspersonen	12-14
1.1 Klinische Daten zu den einzelnen Erkrankungen	15-24
2. Freisetzung von Histamin aus basophilen Granulozyten	25-36
2.1 Herstellung der Leukozytensuspension	25
2.2 Durchführung der Experimente	25-28
2.3 Histaminbestimmung	29
2.4 Berechnung der freigesetzten Histaminkonzentration	29-30
2.5 Reagentien und Material zur Histaminbestimmung	31-34
2.6 Allgemeine Versuchsbedingungen	35-36
3. Stimulationen	37-44
3.1 Anti-Ig E	37
3.2 Ca-Ionophore	37
3.3 Kälte / Wärme	38
3.4 Mechanische Stimulation	39
3.5 Osmotische Stimulation	40-41
3.6 Bestrahlung mit UVA 10J und 20J / cm	42-44
4. Freisetzung von β -Glucuronidase und LDH	45-50
4.1 β -Glucuronidase-Bestimmung	47
4.2 LDH-Bestimmung	48
4.3 Reagentien und Material zur β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung	49-50
5. Statistische Auswertung	50-52

ERGEBNISSE	Seite
1. Anti-Ig E- induzierte Histaminfreisetzung	53-64
1.1 Patienten und Methoden	53-54
1.2 Fragestellungen	55-56
1.3 Ergebnisse	56-64
2. Ca-Ionophore- induzierte Histaminfreisetzung	65-87
2.1 Patienten und Methoden	65-66
2.2 Fragestellungen	66-67
2.3 Ergebnisse	68-87
3. Kälte- bzw. Wärme- induzierte Histaminfreisetzung	88-97
3.1 Patienten und Methoden	88-90
3.2 Fragestellungen	91-92
3.3 Ergebnisse	93-97
4. Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung	98-110
4.1 Patienten und Methoden	98-99
4.2 Fragestellungen	99-100
4.3 Ergebnisse	101-110
5. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung	111-130
5.1 Patienten und Methoden	111-112
5.2 Fragestellungen	113-114
5.3 Ergebnisse	114-130
6. UVA- induzierte Histaminfreisetzung von Histamin, β-Glucuronidase und LDH	131-174
6.1 Patienten und Methoden	131-134
6.2 Fragestellungen	134-136
6.3 Ergebnisse der Histamin-Bestimmung	136-165
6.4 Ergebnisse der β-Glucuronidase-Bestimmung	166-170
6.5 Ergebnisse der LDH-Bestimmung	171-174

DISKUSSION	Seite
1. UVA-Effekte	175-211
1.1 Bestrahlung mit UVA; historische Aspekte	176-177
1.2 Methodische Aspekte	178-199
1.2.1 Auswahl der Lichtquellen	178-180
1.2.2 Durchführung der Bestrahlung	180-184
1.2.3 Einflüsse der Umgebung	184-186
1.2.4 Auswahl der Dosis	186-199
1.3 Wirkungen von UVA auf Zellsuspensionen	199-202
1.4 Wirkung von UVA auf die Histaminfreisetzung	202-211
2. Wirkung von Anti-Ig E und Ca-Ionophore auf die Histaminfreisetzung; Rolle des "Spontan"-Release	212-217
3. Wirkung von physikalischen Stimuli auf die Hist- aminfreisetzung	218-224
ZUSAMMENFASSUNG	225-226
DATENANHANG	227-236
LITERATURVERZEICHNIS	237-247

EINLEITUNG

Die Reaktionen des menschlichen Körpers auf Sonnenstrahlung, insbesondere des UV-Anteils, sind sehr komplex und betreffen nicht nur die Haut, sondern auch das Immunsystem (47). Verschiedene Dermatosen, in deren Pathogenese zum Teil immunologische Vorgänge eine Rolle spielen, werden erfolgreich mit UV - Licht behandelt (17, 47, 98). In neuerer Zeit gewann auch die Photochemotherapie, d.h. die gleichzeitige Anwendung photosensibilisierender Substanzen, z.B. Methoxypsoralen und UVA (PUVA) an Bedeutung, insbesondere zur Therapie der Psoriasis, aber auch bei anderen Dermatosen, wie z.B. Mycosis fungoides und atopischem Ekzem (59, 60). Im übrigen konnten günstige Effekte von Sonnenlicht auf leistungsphysiologische Parameter durch Beeinflussung von Atmung und Herzfrequenz, sowie auf das allgemeine Wohlbefinden nachgewiesen werden (32).

Es ist jedoch allgemein bekannt, daß der ultraviolette Anteil der Sonnenstrahlung, der in einem Bereich von 290 - 400 nm die Erde erreicht, neben der erwünschten Bräunung durchaus auch schädliche Wirkungen hat: So ruft der UVB - Anteil zwar über eine anfängliche Entzündung, die vor weiterer UV - Einwirkung schützende, sog. "Lichtschwiele" hervor (89), ist andererseits jedoch für die chronischen Lichtschäden und die daraus resultierende kanzerogene Wirkung verantwortlich. Kanzerogenität des UV - Lichts wird von einigen Autoren auch im Zusammenhang mit dessen Einfluß auf das Immunsystem gesehen: UVB hemmt z.B. die Abstoßung von antigen wirksamen UV - induzierten Tumoren auf Mäusehaut (zitiert in: 61); nach UV - Bestrahlung entstehen im Lymphgewebe von Mäusen Suppressorzellen, wobei nach deren Übertragung auf andere Mäuse bei diesen die Entstehung von UV - induzierten Tumoren gefördert wurde (15, 61).



Ein weiterer Einfluß von UVB auf das Immunsystem zeigte sich durch eine Hemmung der Kontaktsensibilisierung und der Hauttransplantatabstoßung (61, 47).

Bei Personen mit sonnengeschädigter Haut konnte klinisch eine verminderte Reaktion auf Sensibilisierung mit DNCB nachgewiesen werden (12).

In vitro fand sich ebenfalls ein Einfluß von UV - Licht auf Zellen des Immunsystems:

UV - Bestrahlung führte zu Verminderung von peripheren Lymphozyten (60) und bei Anwendung besonders der kürzeren Wellenlängen auch zu deren Abtötung (9, 26). Auch die Funktion der Lymphozyten wurde beeinträchtigt; sie verloren ihre Fähigkeit zur Rosettenbildung und zur Reaktion auf Mitogenstimulation (57, 58, 59, 60).

Neben den Lymphozyten, welche sich in den Gefäßen, also in der Dermis befinden, sind besonders die epidermalen Langerhanszellen von den Wirkungen des UV - Lichts betroffen. Sie werden als äußerste Station des Immunsystems angesehen (59) und man vermutet, daß sie in der Epidermis die Funktion der Antigenpräsentation übernehmen (103) und daher einen möglichen Einfluß bei der Entstehung der Kontaktallergie haben (59, 60).

Ultrastrukturelle Studien mittels Licht- und Elektronenmikroskopie zeigten eine Verminderung und Schädigung von Langerhanszellen nach UV - Bestrahlung (28, 35).

Alle bisher genannten Wirkungen von UV - Licht, wie Kanzerogenese und Einwirkung auf das Immunsystem, gelten uneingeschränkt für den kürzerwelligen Anteil der natürlichen Strahlung, nämlich für UVB. Der UVC - Anteil des Sonnenspektrums wird absorbiert, bevor er zur Erde gelangt.

Die Wirkungen des längerwelligen Anteils UVA (320-400 nm) (105) sind in der Literatur wesentlich uneinheitlicher beschrieben. Am besten erforscht ist die Anwendung von

UVA zusammen mit photosensibilisierenden Stoffen in der Photochemotherapie, wie z.B. von Psoralenen bei der PUVA-Therapie.

Was die Wirkung von PUVA auf periphere Lymphozyten betrifft, so zeigten sich ähnliche Phänomene wie bei der Anwendung von UVB. Es resultierte eine verminderte Lymphozytenzahl, wobei dies wahrscheinlich auf einem Angriff der Psoralene an der Zellmembran beruht. So konnte mittels der Trypanblaumethode nachgewiesen werden, daß periphere Lymphozyten in Sekundenschnelle nach PUVA - Anwendung abgetötet werden (3). Demgegenüber existiert durch PUVA auch eine Beeinflussung der DNA - Synthese, welche aber wesentlich langsamer vor sich geht und sich durch eine verminderte ^3H -Thymidin-Einkorporation entweder nach Mitogenstimulation (25), oder auch ohne Stimulation (48, 49), verifizieren läßt. Die Beeinträchtigung der Reaktion menschlicher Lymphozytenkulturen auf Mitogenstimulation war auch histologisch untersucht worden (93), wobei die meisten Zellen Zyto-lyse und pyknotische Zellkerne aufwiesen.

Nachdem PUVA in der Lage ist, in das Immunsystem einzugreifen, stellt sich die Frage, welche Rolle die alleinige UVA - Bestrahlung dabei spielt. Bisher war UVA in dieser Hinsicht für relativ inert gehalten worden (98); Anfang dieses Jahrhunderts wurde ihm keinerlei pathogene Wirkung zugeschrieben (105).

Immerhin macht UVA ca. 90 % der globalen UV - Strahlung aus (63) und wird neuerdings durch spezielle Apparaturen mit höherem UVA - output zu kosmetischen Zwecken der Bevölkerung zugänglich gemacht (19, 33, 108). Auch nur geringe Wirkungen auf das Immunsystem oder eine eventuelle Kanzerogenese dürfen daher nicht vernachlässigt werden, insbesondere, da das langwellige UVA bis in die Dermis und zu deren Blutgefäßen vorzudringen vermag (14, 48, 49, 51, 68, 90).

Auch das Bindegewebe wird verändert: An Mäusen gelang es, durch UVA - Bestrahlung eine Hyperplasie der elastischen Fasern der Dermis zu erzeugen (45).

An menschlicher Haut zeigten sich nach UVA - Bestrahlung elektronenmikroskopische Veränderungen an den Endothelien der Blutgefäße, wohingegen die Epidermis unbeschädigt blieb (51). D.h. also, daß UVA ebenso wie UVB ultrastrukturelle Veränderungen der Haut bewirken kann, wenn auch sehr viel höhere Dosen dafür nötig sind.

Über das onkogene Potential von UVA wird noch diskutiert; jedoch konnten bei Mäusen nach langen Expositionszeiten und entsprechend hohen kumulativen Dosen unter bestimmter zeitlicher Dosisverteilung Hauttumoren nachgewiesen werden (19, 108).

An menschlicher Haut manifestiert sich der UVA-Effekt vor allem in der Pigmentierung, zuerst in der Sofortpigmentierung, welche zuerst von Hausser beschrieben wurde, als sie 1938 das erste Aktionsspektrum für UVA präsentierte (zitiert in: 105).

Auch das Auftreten eines Soforterythems ist beschrieben, dessen zeitlicher Verlauf in neuerer Zeit wieder untersucht wird (38). Eine nicht unumstrittene Beobachtung ergab, daß Vorbestrahlung menschlicher Haut mit UVA die erythematogene Wirkung von UVB erheblich steigern kann, und zwar über rein additive Wirkungen hinaus. Dieses Phänomen wurde Photoaugmentation genannt (99, 110) und könnte darauf hinweisen, daß UVA möglicherweise die Entstehung des Sonnenbrandes fördern kann. Auch aus diesem Grund kann UVA nicht länger als absolut harmlos angesehen werden.

Untersuchungen der Wirkung von UVA auf das Immunsystem zeigen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Als einziges morphologisches Korrelat für eine mögliche immunsuppressive Wirkung an menschlicher Haut fanden sich verminderte und geschädigte Langerhanszellen in der Epidermis (61).

Allerdings ist UVA bei der Auslösung von verschiedenen immunologischen und allergischen Erkrankungen beteiligt, z.B. bei Sonnenurtikaria und Photoallergie (43, 44, 61, 71, 98).

Auch ist UVA - Bestrahlung geeignet, bei Urämie oder bei allergischen Erkrankungen wie z.B. dem atopischen Ekzem, den Juckreiz zu lindern (17).

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Einflüsse von UVA auf das Immunsystem zu untersuchen, speziell auf die Histaminfreisetzung basophiler Granulozyten, welche in ihrer Funktion des Mastzellen des Gewebes entsprechen. Zu diesem Thema existieren erst wenige Arbeiten, da erst seit relativ kurzer Zeit geeignete Geräte mit genügend hohem UVA - Anteil bereitstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein solches Gerät mit hoher Intensität für UVA und vernachlässigbarer UVB - Strahlung verwendet (62).

Die Untersuchungen sollten an gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit atopischen Erkrankungen durchgeführt werden.

Die Pathogenese des atopischen Ekzems ist weitgehend ungeklärt. Neben erhöhten Ig E- Spiegeln und Störungen der T-Zell-Regulation werden Veränderungen der Mediatorfreisetzung diskutiert.

So zeigen Patienten mit atopischem Ekzem, besonders im Schub, deutlich über die Norm erhöhte Serum - Histaminspiegel (76, 83). Es konnte gezeigt werden, daß das Serum - IgE sehr gut mit dem für die Mediatorfreisetzung relevanten zellgebundenen IgE korreliert, nicht jedoch die Menge des zellgebundenen IgE mit der Reaktion auf ein spezifisches Antigen, oder Anti - IgE (7). Daraus wurde geschlossen, daß für die Mediatorfreisetzung noch ein anderer, nichtimmunologischer Parameter von Bedeutung sein müsse, der als "Releasability" bezeichnet wurde. (7, 8, 85).

Dieses Phänomen, d.h. also die Tatsache, daß Atopiker leichter vasoaktive Mediatoren freisetzen, wird als Teil einer veränderten pharmakologischen Reaktivität (82, 84) gesehen, an der diese Patienten leiden: Sie zeigen eine Überempfindlichkeit auf alpha-adrenerge und cholinerge Reize, reagieren jedoch nur schwach auf β -adrenerge Stimuli (Theorie der β -Blockade von Szentivanyi (102)). Als second messenger zur Vermittlung dieser Reaktionen dient das zyklische Nukleotidsystem (cAMP), sodaß zur Erklärung der erhöhten Releasability bei Atopikern u.a. ein Ungleichgewicht im intrazellulären cAMP-System in Erwägung gezogen wird (82, 84, 85, 86).

Die Ursache für dieses Ungleichgewicht und für die erhöhte Mediatorfreisetzung ist nicht bekannt; es werden genetische, hormonelle und infektiöse Einflüsse, sowie Autoantikörper diskutiert (82).

Bei der Erforschung der Mediatorfreisetzung wurden zahlreiche verschiedene Stimuli untersucht, meist immunologischer oder pharmakologischer Art (Antigene, Medikamente, Peptide, u.a.) (29); es existieren jedoch nur wenige Studien über die Wirkung physikalischer Stimuli.

Da die Histaminfreisetzung ein aktives Geschehen darstellt, indem die Mediatoren durch Extrusion von Granula ausgeschleust werden (29, 87), wurde in dieser Arbeit bei der Stimulation mit UVA zusätzlich die Freisetzung von β -Glucuronidase (ebenfalls aktives Geschehen) und LDH (Freisetzung bei Zytolyse) bestimmt, um den zytotoxischen Anteil des Release zu erfassen.

Bei allen Patienten wurde zusätzlich zur physikalischen Stimulation ein immunologischer Stimulus getestet, nämlich Anti-Ig E, sowie ein nichtimmunologischer, jedoch die aktive Mediatorfreisetzung stimulierender Stoff, nämlich Ca-Ionophore.

Die Ziele dieser Arbeit umfassen hauptsächlich folgende Untersuchungen:

- In vitro-Effekt von UVA auf die Histaminfreisetzung basophiler Granulozyten
- Vergleich verschiedener Erkrankungen
- Effekt verschiedener Bestrahlungsmodalitäten auf die Mediatorfreisetzung; insbesondere die Bedeutung der bestrahlten Oberfläche der Zellsuspension unter Verwendung verschieden großer Reaktionsgefäße.

Ferner wurden auch folgende physikalischen Reize hinsichtlich ihres Effektes auf die Histaminfreisetzung basophiler Granulozyten in vitro untersucht:

- Wärme / Kälte
- Mechanische Stimulation
- Osmotische Stimulation

MATERIAL UND METHODIK

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktionsfähigkeit von Leukozyten *in vitro* auf physikalische Reize untersucht. Dies geschah durch Einfluß von Wärme und Kälte, osmotischen Reizen, mechanischer Stimulation und durch Bestrahlung mit UVA. Auf letzterer lag das Schwergewicht der Untersuchungen. Die Reaktionsfähigkeit wurde in erster Linie anhand der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten gemessen; bei den Bestrahlungsexperimenten wurde zum Teil auch zusätzlich noch β -Glucuronidase als lysosomales Markerenzym der neutrophilen Granulozyten (53) und LDH als zytoplasmatisches Markerenzym bestimmt.

1. Auswahl der Versuchspersonen

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 108 Probanden (61 Normalpersonen und 47 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen) der Dermatologischen Poliklinik der Universität München durchgeführt. Durchschnittsalter, Geschlecht und Diagnosen zeigt Tabelle 1:

Tabelle 1

	Anzahl d. Patienten	w	m	Durchschnitts- alter in Jahren	jüngster Patient	ältester Patient
Insg.	108	55	53	37.9	13	84
N	61	34	27	41.1	17	84
All	32	15	17	28.8	13	78
U	9	2	7	43.9	21	70
Ph	6	4	2	42.3	21	81

Bem: Normalpersonen waren Klinikpersonal und solche Patienten, deren Erkrankungen keinen Einfluß auf die Histaminfreisetzung erwarten ließen und bei denen sich keinerlei Hinweise auf atopische Erkrankungen oder sonstige Allergien fanden.

Die Patienten mit allergischen Erkrankungen wurde in Anlehnung an Erkenntnisse früherer Untersuchungen (107) weiter aufgeteilt; vgl. Tabelle 2:

Tabelle 2

	Anzahl d. Patienten	w	m	Durchschnitts alter in Jahren	jüngster Patient	ältester Patient
Insg.	13	17	15	28.8	13	78
AE	8	7	1	23.6	14	44
A(-E)	16	7	9	32.9	13	78
sonst.	8	3	5	25.9	15	46
All						

Bem: Bei den sonstigen Allergien befanden sich 5 Patienten mit Insektengift- Allergie und 3 Patienten mit allergischem Kontaktekzem.

Insgesamt ergibt sich also eine Aufteilung in :

- Normalpersonen	N
- Patienten mit allergischen Erkrankungen	All
- Patienten mit atopischen Erkrankungen	A
Patienten mit atopischem Ekzem	AE
Patienten mit atopischen Erkrankungen ohne Ekzem	A(-E)
- Patienten mit sonstigen Allergien	(bei All aufgeführt)
- Patienten mit Urtikaria	U
- Patienten mit Photodermatosen	Ph
- Patienten mit allergischem Kontaktekzem	All.KE

Bem: Unter den Patienten mit atopischem Ekzem wiesen 4 Probanden zugleich Anzeichen für eine respiratorische Atopie auf.

Eine Aufteilung der Patienten in einzelne Erkrankungen, sowie die genaue Unterteilung der Experimente findet sich (nochmals) im Ergebnisteil zu Beginn der jeweiligen Untersuchung.

1.1 Klinische Daten zu den einzelnen Erkrankungen

PATIENTEN MIT ATOPISCHEN ERKRANKUNGEN

Name +Nr.	Alter (Jahre)	m/w	Atopieanamnese EA FA	pos. Hauttest (Prick-Test)	RAST (Klasse)	Ges-IgE in U/ml
1 B.J.	43	w	R, As	Gräser +++ D.pter. +++ Katze +	Gräser 4 D.pter.3 D.farin.2	186
2 G.K.	20	m	E, As	Gräser + Tierhaare +		> 600
3 H.V.	33	m	R	Kräuter + Robinie + D.pter. + Katze (+)	Candida 3	
4 H.R.	21	m	R, Schwester R	Gräser ++ Katze (+)		
5 K.M.	36	m	R, As	Gräser ++ Beifuß ++ Katze +	Gräser 3 Beifuß 3	
6 K.M.	17	m	R, Bruder R	Gräser +++ Bäume +++ Kräuter +++ Katze (+)		
7 K.W.	20	m	R, Mutter R Bruder R	Gräser +++ Bäume +++ Kräuter +++ Katze (+)	Ruchgras 4 Platane 3 Beifuß 3 Spitzwegerich 2	

Name + Nr	Alter (Jahre)	m/w	Atopieanamnese EA FA	pos. Hauttest (Prick-Test)	RAST (Klasse)	Ges.-IgE (U/ml)
8						
M.M.	42	w	R, As, Sohn R	Gräser +++ Bäume +++ Kräuter ++ Curry +++ Anis +++	Gräser 1 Erle 4 Hasel 4 Birke 4 Wegerich 2 Beifuß 3	
9						
M.P.	13	m	R, Mutter R Bruder R	Gräser +++ Bäume ++ Katze +	Gräser 4 Birke 4 Hasel 3	
10						
M.M.	17	w	R, E	Gräser +++ Katze ++ D.pter.(+).	Beifuß 1	13
11						
O.H.	27	m	R, Vater R Onkel R	Gräser +++ Kräuter ++ Katze +	Gräser 4 Roggenmehl 2 Beifuß 2 Gänsefuß 3	320
12						
R.G.	24	w	R, E			360
13						
W.I.	30	w	R, As	Gräser ++++ Bäume ++++ Kräuter +++ Hausstaub +		
14						
S.C.	22	w	R, As, E	Fisch + Schalentiere + Banane + Orange +	Tomate 1	

Name +Nr	Alter (Jahre)	m/w	Atopieanamnese EA FA		Pos. Hauttest (Prick-Test)	RAST (Klasse)	Ges.-IgE (U/ml)
15							
S.H.	23	m	R		Gräser + Bäume +++	Grauerle 3 Warzenbirke 4 Hasel 3 Buche 2	55
16							
V.G.	22	m	R				192
17							
H.M.	56	w	E				720
18							
L-F.	35	w	R, As, Bruder Onkel As	R	Gräser + Stoffe +		
19							
S.M.	42	w	R		Fusarium spp + D.pter.(+)		<10
20							
W.C.	29	w	R, As				36
21							
W.K.	14	w	E	E	Gräser ++ D.pter.++		
22							
W.E.	26	w	E				88
23							
W.E.*	21	w	E		D.pter.+ Hausstaub + Kräuter +		880
E.U.	47J	w	R		D.pter. + D.farinae +++		
24							

R = Rhinitis allergica

EA = Eigenanamnese

As = allergisches Asthma

FA = Familienanamnese

E = atopisches Ekzem

Ges-IgE = Gesamt-IgE (PRIST)

* = Diese Patientin hatte zusätzlich eine polymorphe Lichtdermatose, weshalb die Patientin auch unter Lichtdermatosen aufgeführt ist.

Bem: Die Namen der Patienten sind durch die Abkürzungen ihrer Initialen angegeben; zuerst steht der Familienname.

PATIENTEN MIT ALLERGIE GEGEN BIENEN- UND WESPENGIFT

Name +Nr.	Alter (Jahre)	m/w	Atopie- anamnese	Spezielle Anamnese	Positive Hauttests	RAST (Klasse)	Ges-IgE (U/ml)
25							
H.M.	14	m	R	starke LR	Biene +++ Wespe ++	Biene 3 Wespe 0	210
26							
S.H.	17	m		AR	Biene + Wespe (+)	Wespe 3	80
27							
L.C.	41	w		starke LR	Biene (+) Wespe +++	Wespe 0	20
28							
Z.M.	19	m		starke LR AR	Biene + Wespe +	Biene 3 Wespe 1	> 1200

LR = Lokalreaktion AR = Allgemeinreaktion

Bem: Die Patienten Nr. 26 und 28 werden derzeit hyposensibilisiert.

PATIENTEN MIT URTIKARIA

Name +Nr.	Alter (Jahre)	m/w	Atopie- anamnese	Spezielle Anamnese + Diagnose	Positive Hauttests (Prick-Test)	Ges-IgE (U/ml)
29						
C.P.	25	m		V.a.Kontakturtikaria auf Seezunge		300
30						
F.L.	64	w		Quaddeln und Quincke- Ödeme nach Kur an der Nordsee		10
31						
F.J.	70	m		Chron. rezidiv. Quincke-Ödem	Schalentiere + Weichtiere +	
32						
G.R.	54	w		Nach dem Essen und nach Tierkontakt Quaddeln, Übelkeit und Diarrhoe		
33						
K.P.	21	w	E als Kind	Akute Urtikaria Quincke-Ödeme Schockgefahr	Ei+ Gemüse + Milcheiweiß + Schalentiere + Nüsse +	74
34						
M.M.	31	w		Wärmeurtikaria (lokalisiert)	Candidin + Physikal.Test (Wärme) pos.	
35						
P.A.	49	w	Sohn R	Urtikaria faktitia	Mechan.Auslösung +	

Z.O.	37J	w	Chron.Urticaria	Fokussuche neg.
36			V.a. Urticaria- vaskulitis	Immunkomplexe und Immunglobuline normal
K.D.	44J	w	V.a. Analgetika- idiosyncrasie:	Medikamente neg
37			4h nach Delphi- Mix-Injektion Quaddeln, Atemnot	

PATIENTEN MIT PHOTODERMATOSEN

Name	Alter	m/w	Atopieanamnese		Diagnose
+Nr. (Jahre)			EA	FA	
38					
H.J.	28J	w			PLD
39					
P.W.	30J	m			LE-artige PLD (LE konnte ausgeschlossen werden)
40					
S.W.	51J	m		Enkel R,E	chronisch diskoider LE
41					
S.A.	81J	m			V.a.Photoallergisches Kontakt- ekzem bei atopischer Diathese
42					
M.A.	40J	m			PLD
23					
W.E.*	21J	w		E	Atopisches Ekzem und PLD

HV = Hautveränderungen

LE = Lupus erythematodes

PLD = Polymorphe Lichtdermatose

Bem: Die Patientin Nr. 23 wird
auch bei den Patienten mit
atopischem Ekzem aufgeführt.

Lichttestung :		
MED (mit UVB)	Provokation mit UVA	Provokation mit UVB
80mJ/cm ² bei 300nm normal	100+100+100J/cm ² normal	Lichttreppe re + li glutäal identisch
57mJ/cm ² poly- chromatisch normal	100+100+100J/cm ² sukkulente Papeln	
40mJ/cm ² bei 300nm normal, 113mJ/cm ² polychrom. normal	50+100J/cm ² normal	2, 4, 6-fache MED nur Rötung

100+100+100J/cm²
erythematöse Papeln.

Bem: Testung der MED bei UVB: (71a)

Monochromatisch: Gittermonochromator mit Xenonlampe

Polychromatisch: Leuchtstoffröhre mit überwiegendem

UVB-Anteil: Philips TL 20W/12

Provokation mit UVA: UVASUN 5000, Mutzhas

PATIENTEN MIT SONSTIGEN ALLERGIEN *

Name +Nr. (Jahre)	Alter	m/w	Atopie- anamnese	Anamnese + Diagnose	Positive Hauttests
43					
K.J.	18	w	neg.	seit Pubertät leichtes Asthma, im Beruf schlimmer	
43					
44					
M.P.	25	w	neg.	Allerg.Kontaktekzem im Gesicht	Kolophonium + Rouge Manhattan + Abdeckstift +
45					
W.B.	46	w	neg.	Allerg. Kontaktekzem an den Händen	Nickelsulfat +
46					
S.H.	28	m	neg.	Allerg. Kontaktekzem an den Händen	Nickelsulfat + Kolophonium + Paramix + Paraphenylendiamin +
47					
K.W.	16	m	neg.	Starke Lokalreaktion nach Insektenstich	Gräser + Kräuter + D.pter. + Hausgrille (+)

* Hierbei handelt es sich um Patienten, die sich in die vorangegangenen Kategorien nicht einordnen ließen.

2. Freisetzung von Histamin aus basophilen Granulozyten

2.1 Herstellung der Leukozytensuspension

Den Patienten wurden 40 ml Blut in zwei heparinisierten Spritzen abgenommen und mit je 10 ml Macrodex 6 % verdünnt. Die Spritzen wurden 2 - 4 Stunden senkrecht fixiert, bis die Erythrozyten sedimentiert waren und der Leukozyten-Überstand gewonnen werden konnte. Dieser wurde mittels eines großlumigen Butterfly in Plastik-Zentrifugenröhrchen umgefüllt und anschließend insgesamt dreimal zentrifugiert; jeweils 10 min. bei + 4 C und 1200 U/min.

Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die verbleibenden Leukozyten mit TCM - Puffer, pH 7.4, aufgeschwemmt, wobei man die Zellen mittels einer Plastikpipette vorsichtig suspendierte. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in ein 50-ml-Falcon-Plastik-Röhrchen (mit Skalierung) gegeben und bis zur 10 ml- Marke mit TCM-Puffer aufgeschwemmt.

Die Zellen dieser Suspension wurden in einer Neugebauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt und anschließend wurde die Suspension in den Falcon-Röhrchen je nach Zellzahl soweit mit TCM-Puffer verdünnt, bis eine Konzentration von 2 Mio Zellen/ml entstand.

2.2 Durchführung der Experimente

Hierzu wurden je 0.5 ml der oben gewonnenen Zellsuspension in kleine Plastik-Analysenröhrchen von 10 mm Durchmesser gegeben, d.h., in jedem Röhrchen befanden sich ca 1 Mio Zellen.

Für jeden Stimulus wurden 2 Analysenröhrchen verwendet, also Doppelwerte bestimmt.

Durchgeführt wurden folgende Stimulationen:

- 100 %-Wert, d.h. maximale Histaminfreisetzung durch
Zugabe von Perchlorsäure 70 %
- Leerwert, d.h. Spontanfreisetzung von Histamin ohne
Stimulation
- Stimulation mit Anti- Ig E 10^{-2}
- Stimulation mit Ca - Ionophore $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$,
- Physikalische Stimulation: Kälte/Wärme
Mechanisch
Osmotisch
UVA 10J /20J/cm²

Für den 100 %-Wert wurde der Zellsuspension von 0.5 ml noch 100 μ l Perchlorsäure 70 % zugegeben; für die Werte von Anti-IgE und Ca -Ionophore ebenfalls jeweils 100 μ l der entsprechenden Substanz. Um in den Röhrchen für den Leerwert und die physikalischen Stimuli die gleiche Flüssigkeitsmenge zu erhalten, wurden hier jeweils 100 μ l TCM-Puffer zugefügt.

In jedem Analysenröhrchen befanden sich also 0.5 ml Zellsuspension und 100 μ l Reagens bzw. TCM-Puffer, also insgesamt 0.6 ml Reaktionsvolumen.

Beispiel für einen Testansatz (Pipettierschema)

Reagentien						
Röhrchen	Zell-	TCM-	Perchlor.	Anti-	Ca -Ion.	Stimulation
Nr.	susp.	Puffer	70 %	Ig E		
	(ml)	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(μ l)	
1+2	0.5	100				LW
3+4	0.5		100			100%-Wert
5+6	0.5			100		Anti-IgE 10^{-2}
7+8	0.5				100	Ca -Ion. 10^{-3}
9+10	0.5				100	Ca -Ion. 10^{-4}
11+12	0.5				100	Ca -Ion. 10^{-5}
13+14	0.5	100				Kälte/Wärme
15+16	0.5	100				Osmose
17+18	0.5	100				Mechanisch
19+20+21	0.5	100				UVA 10J/20J/cm ²

Der Übersichtlichkeit halber sind bei den physikalischen Stimulationsarten Wärme/Kälte, Osmose, mechanische Stimulation und UVA-Bestrahlung nur je 2 Analysenröhrchen angegeben. Jede Stimulationsart war jedoch noch in zahlreiche Einzelstimulationen untergliedert (z.B. Osmotische Reize durch NaCl, Aqua dest. und Mannit), sodaß sich eine wesentlich größere Anzahl von Analysenröhrchen ergab. In allen aber befanden sich ebenso 0.5 ml Zellsuspension und 100 μ l Puffer, wie es das Schema für die 4 physikalischen Stimulationsarten angibt.

Bem: Der Testansatz für die osmotische Stimulation wurde anschließend abzentrifugiert und zu den verbleibenden Zellen die gleiche Menge osmotisch wirksames Medium zugegeben; vgl. 3.5.

Zudem geht aus dem Schema hervor, daß bei der Bestrahlung mit UVA nicht Doppelwerte, sondern wegen der größeren Streubreite Dreifachwerte angesetzt wurden. (Auf die Unterteilung der 4 physikalischen Stimulationsarten in Einzelstimulationen wird bei deren gesonderter Besprechung eingegangen, vgl. physikalische Stimulationen).

Nach Beendigung der Experimente wurden alle Analysenröhrchen 10 min. bei + 4°C und 1200 U/min. zentrifugiert: Von den vorher 0.6 ml Flüssigkeit blieben ca 0.55 ml Überstand, der das freigesetzte Histamin enthielt. Dieser Überstand wurde nun in neue Analysenröhrchen gegeben, welche zuvor mit 0.5 ml 2 % -Perchlorsäure gefüllt worden waren. Diese Maßnahme diente zum Enteiweißen der Proben für die Histamin-Analyse.

2.3 Histaminbestimmung.

Die heute am meisten verwendete Methode zur Histaminbestimmung ist der fluorophotometrische Nachweis nach SHORE et al.(95) Sie wurde von SIRAGANIAN et al.(97) zu einer automatisierten Methode (Autoanalyzer) weiterentwickelt, die auch bei den vorliegenden Untersuchungen angewendet wurde. Zuerst erfolgt Reinigung der enteweißten Proben durch Butanolextraktion, dann wird o-Phthaldialdehyd (OPT) an Histamin gekoppelt, wodurch ein fluoreszierender Farbstoff entsteht (Aktivierung bei 350 nm). Die Fluoreszenz wird bei 450 nm photometrisch gemessen und ist proportional der Konzentration des freigesetzten Histamins.

2.4 Berechnung der freigesetzten Histaminkonzentration

Die Konzentration in ng/ml ergab sich aus den vom Schreiber des Autoanalyzers erstellten Kurven nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Ausschlag (Probe)} \times \text{Verdünnung} \times 10}{\text{Ausschlag Standard} - \text{Baseline}} = \text{Analyse in ng/ml}$$

- Baseline : theoretische Nulllinie auf dem Kurvenblatt
- Standard : zur Eichung;
die Konzentration = 10 ng Histamin/ml
- Verdünnung der Analysen : 1:2
(0.5ml Analyse + 0.5ml Perchlorsäure 2%)
des 100 %-Werts: 1:3
(0.5ml Analyse + 1ml Perchlorsäure 2%).

Um die Histaminfreisetzung verschiedener Patienten miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte nicht absolut, also in ng/ml, sondern in % vom jeweiligen 100%-Wert angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde von den Analysenwerten noch der Leerwert subtrahiert. Sollten bei der statistischen Auswertung die "Leerwerte" miteinfaßt werden, wurden sie nicht abgezogen.

Üblicherweise werden Analysenwerte, die kleiner als der Leerwert sind, gleich 0 gesetzt. Da bei einigen Stimulationen (insbesondere bei der osmotischen Stimulation mit NaCl 0.9 %) die Analysenwerte z.T. deutlich unter dem Leerwert lagen, wurden die sich ergebenden negativen Werte mit in die Statistik aufgenommen. Diese Sonderfälle werden jeweils zusätzlich angegeben.

Bei den Versuchen mit UVA-Bestrahlung der Zellen zeigte sich, daß der Leerwert von einigen Gegebenheiten abhängig war, die sich experimentell nicht vermeiden ließen, z.B. Abhängigkeit von der Experimentierzeit und von der der Umgebung ausgesetzten Oberfläche der Zellsuspension (in Makrotiterplatten wesentlich höher als in Analysenröhrchen). Man kann also, selbst ohne beabsichtigte Stimulation, eigentlich nicht von einem "Leer"-wert ausgehen; sodaß diese Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit verlassen wird und besser von "Spontan"-Release gesprochen wird.

2.5 Reagentien und Material zur Histaminbestimmung

- Macrodex 6 % 6 % Dextran 60 in physiologischer Kochsalzlösung (Knoll, Ludwigshafen)

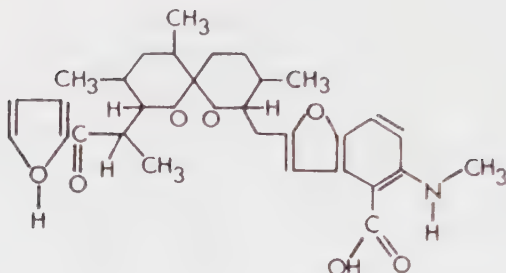
- TCM - Puffer TCM steht für Tris, Ca und Mg
 Für 1 l: Tris (3g), NaCl (7g),
 KCl (0.3g), $MgCl_2 \times 6 H_2O$
 (0.2g), $CaCl_2 \times 2 H_2O$
 (0.147g) in Aqua dest.
 Die Lösung wird anschließend auf einen pH von 7.4 titriert
 (bei Zimmertemperatur)

- Perchlorsäure - 70 % zur Herstellung des 100 %-Werts (Gesamt-Histaminfreisetzung durch Zellzerstörung)
 - 2 % zum Enteiweißen der Analysen vor der Histaminbestimmung.
 (Merck, Darmstadt)

- Anti-IgE-Serum Anti-Human-IgE vom Kaninchen mit einem Antikörpertiter von 492279 IU/ml (Behringwerke AG, Marburg). Aufgrund von zahlreichen Vorversuchen wurde eine Verdünnung mit TCM-Puffer von 10^{-2} verwendet. Aufbewahrung bei $+ 4^{\circ} C$

- Ca²⁺-Ionophore (Elli Lilly, Landsberg)
 A 23187 Zuerst wurde eine Lösung von 1 mg/ml in 1% Methanol hergestellt, wovon Verdünnungen mit TCM-Puffer von 10^{-3} , 10^{-4} , und 10^{-5} verwendet wurden. Aufbewahrung bei $- 20^{\circ} C$.

Ca -Ionophore:



- D-Mannitol (Sigma, Deisenhofen)
(=Mannit) Zur osmotischen Stimulation werden Konzentrationen von 1, 5, 7.5 und 10% in TCM-Puffer hergestellt; Aufbewahrung bei + 4°C
- M4125
- NaCl -4,1 %: Herstellung einer Lösung aus 4.1g NaCl (Merck, Darmstadt) und 100ml Aqua dest.
-0.9 %: gebrauchsfertige isotone Kochsalzlösung (Pfrimmer + Co, Erlangen). Beides diente zur osmotischen Stimulation.
- Aqua destillata (Apotheke der Universität München) zur osmotischen Stimulation.
- Zentrifugenröhrchen Innendurchmesser 1.5 cm
aus Polystyrol (Greiner, München) zum Zentrifugieren der Zellsuspension.

- Analysenröhrchen (Greiner, München)
aus Polystyrol Innendurchmesser 10 mm
Außendurchmesser 12 mm
Länge 55 mm.
In ihnen wurden die Stimulationen durchgeführt, sowie die Messung von Histamin im Autoanalyzer

- 50 ml Falcon - Zur Herstellung der endgültigen
Plastikröhrchen Konzentration der Zellsuspension
mit Graduierung wurde das Röhrchen zunächst bis
zur 10 ml - Marke gefüllt, die
Zellen dann gezählt und anschlies-
send weiter verdünnt mit TCM- Puf-
fer (je nach Zellzahl)

- Makrotiter-Platten 12.7 x 8.5 x 1.2 cm
mit Deckel (Greiner München)
aus Polystyrol Innendurchmesser der Vertiefungen
3.5 cm; Tiefe 1 cm.
Zur Bestrahlung mit UVA 10J/20J/cm²

- Pasteur-Plastik- Länge 15.2 cm
pipetten Innendurchmesser der Spitze ca
1.5 mm
- Zur vorsichtigen Suspendierung der
Zellen während des Aufschwemmens
- Für die mechanische Stimulation.

- UVA SUN-Gerät (Mutzhas, München) 320 - 400 nm
zur Stimulation mit UVA-Bestrahl-
ung, 10J und 20J/cm²

- CENTRA -UV -Meter (OSRAM, München),
zur Messung von UVA und UVB.

- Vortex-Genie- (Bender & Holbein AG, Zürich)
Schüttler
Zur mechanischen Stimulation wurde
die maximale Stärke (Stärke 10)
für 1 min angewendet.
- Autoanalyzer (Technicon, Bad Vilbel bei Frank-
furt)

Zugehörige Reagentien:

- OPT-Reagens (Sigma, St.Louis, U.S.A.)
o-Phthalaldehyd 30 ml
Methanol " 1 ml
Aqua bidestillata 50 ml
- Histamin-Phosphat (Eli Lilly, Indianapolis, U.S.A.
No 269 über Fa Paesel, Frankfurt)
Nach Auflösen von 165.6 mg der Sub-
stanz in 100 ml 0.1 N Salzsäure
Herstellung einer Histamin-Stand-
ard-Lösung von 1 g/ml in 0.4 N Per-
chlorsäure.
- n-Butanol (Merck, Darmstadt)
Nr 1990
- n-Heptan (Merck, Darmstadt)
Nr 4379
- 0.4 N Perchlor- (Merck, Darmstadt)
säure
- 1 N und 5 N (Apotheke der Universität München)
Natronlauge
- 0.2 N und 0.6 N (Apotheke der Universität München)
Schwefelsäure

2.6 Allgemeine Versuchsbedingungen

- Zimmertemperatur
- Eingeschaltete Leuchtstoffröhren im Labor
(selbst bei zusätzlichem Tageslicht war mit dem CENTRA-UV-Meter keinerlei UVA- oder UVB-Strahlung meßbar; bei Untersuchungen mit Material von Patienten mit Photo-dermatosen wurden sie aber trotzdem ausgeschaltet)
- Zeitaufwand: - Herstellung der Zellsuspension:

Dies umfaßte Sedimentierzeit, Aufschwemmen und Zählen der Zellen, sowie Herstellung der Endkonzentration von ca 2 Mio Zellen/ml. Wenn das Blut von 4 Patienten auf einmal verarbeitet wurde (wie es meist der Fall war) dauerte das ca 4 Stunden.

- "Experimentierzeit":

Sie entspricht der Verweildauer der Zellsuspension in den Reaktionsgefäßen. Sie reichte vom Abschluß des Pipettierens der fertigen Zellsuspension in die Analysenröhrchen bzw. Makrotiterplatten bis zur letzten Zentrifugation nach Beendigung der Experimente.

Sie war sehr unterschiedlich und hing von Art und Anzahl der jeweiligen Stimulationen ab. Besonders variabel waren die Zeiten bei der UVA-Bestrahlung, da das UVA-SUN-Gerät nicht jederzeit zur Verfügung stand. Meist gelang es jedoch, diesen Zeitraum auf 1 - 3 Stunden zu begrenzen. Insgesamt ergab sich also ein Zeitraum von ca 5 - 7 Stunden, in dem die Zellen stimuliert werden konnten, sei es unspezifisch durch die Vorgänge

beim Herstellen der Zellsuspension, sei es spezifisch durch Stimulation mittels Reagentien oder physikalischer Art.

Die Analysenröhrchen blieben während der gesamten Versuchsdauer unverschlossen, bis auf die Wärme-Stimulation im Wasserbad, wo sie zum Schutz gegen Verdunstung mit Parafilm bedeckt wurden. Die Makrotiter-Platten wurden wegen ihrer großen Oberfläche nach jedem Pipettivorgang wieder mit ihrem Deckel verschlossen; bestrahlt wurden sie allerdings offen, um gleiche Bedingungen wie bei den Analysenröhrchen herzustellen.

Alle Experimente wurden im allergologischen Labor und in der Lichtabteilung der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt.

3. Stimulationen

3.1 Anti-IgE

Die Zelloberfläche von basophilen Granulozyten und Mastzellen trägt Immunglobuline E (IgE), welche mit ihrem Fc-Teil dort fixiert sind. Allergene, sowie Antikörper gegen IgE, (Anti-IgE) verbinden sich mit ihnen in Form einer Brückenbildung. Dieses "bridging" ist der Auslöser für eine Mediatorfreisetzung, vor allem von Histamin.(81)

Für jeden Patienten wurden Doppelwerte bestimmt, d.h. zu je 2 Analysenröhrchen mit je 0.5 ml Zellsuspension wurde je 100 μ l Anti-IgE in der Konzentration 10^{-2} pipettiert. Danach erfolgte 10 minütige Inkubation im Wasserbad bei 37° C. Mit der endgültigen Abzentrifugation der Zellbestandteile wurde solange gewartet, bis die übrigen Stimulationen des Testansatzes fertiggestellt waren (je nach Anzahl 1 - 3 Stunden). Die Konzentration von Anti-IgE 10^{-2} wird sehr häufig verwendet und hat sich bei früheren Untersuchungen als sinnvoll erwiesen (107). Anti-IgE besitzt in dieser Verdünnung bei der fluorophotometrischen Histaminbestimmung keine Eigenfluoreszenz (107).

3.2 Ca -Ionophore

Diese Substanz kann die Zelle direkt stimulieren, indem sie einen "erleichterten Transport" von Kalzium- oder Magnesium - Ionen an den Mitochondrien bewirkt.

In Anlehnung an frühere Untersuchungen im Labor wurden Konzentrationen von 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} g/l verwendet, die ebenfalls keine Eigenfluoreszenz aufwiesen. Für die Stimulation wurden je 100 μ l der jeweiligen Konzentration in die Analysenröhrchen pipettiert (auch hier jeweils Doppelwerte); das weitere Vorgehen entsprach dem bei Anti-IgE. Ein Testansatz für Anti-IgE und Ca -Ionophore ist unter 2.2 schematisch abgebildet.

3.3 Kälte/Wärme

Verwendet wurden ebenfalls pro Patient und Stimulation je 2 Analysenröhrchen mit je 0.5 ml Zellsuspension, wobei je 100 μ l TCM-Puffer zupipettiert wurden, um die gleiche Füllmenge wie bei Anti-IgE- und Ca-Ionophore-Stimulation zu erhalten (0.6 ml).

Für die Wärmestimulation wurden die mit Parafilm verschlossenen Analysenröhrchen 30 min in ein Wasserbad (+ 40° C und + 43° C) gestellt; für die Kältestimulation erfolgte 30 minütige Aufbewahrung im Kühlschrank bei + 4° C. Der "Spontan"-Release entsprach Zimmertemperatur.

Testansatz

Röhrchen Nr.	Zell- susp. (ml)	TCM- Puffer (μ l)	Perchlors. 70 % (μ l)	Stimulationen
1+2	0.5	100		SR, (Zimmertemp.)
3+4	0.5		100	100%, (Zimmertemp.)
13+14	0.5	100		+40° C Wasserbad
14+15	0.5	100		+43° C Wasserbad
15+16	0.5	100		+4° C Kühlschrank

Bem: Die Röhrchen Nr.5-12 wurden für die Stimulation mit Anti-IgE und Ca -Ionophore verwendet. Die endgültige Zentrifugation der Proben erfolgte ebenfalls nach Beendigung des Gesamt-Testansatzes, d.h. nach 1-3 Stunden.

SR = "Spontan"-Release.

3.4 Mechanische Stimulation

- Plastik-Pasteur-Pipetten

Zu je 2 Analysenröhrchen mit 0.5 ml Zellsuspension wurden je 100 μ l TCM-Puffer pipettiert. In jedem einzelnen Röhrchen wurde nun die Zellsuspension möglichst kräftig "suspendiert", indem man versuchte, in der zwischen Daumen und Zeigefinger gehaltenen Pipette eine möglichst hohe Durchflußgeschwindigkeit der Suspension durch die Pipettenöffnung zu erreichen. Dieser Vorgang wurde je 10 mal und je 30 mal durchgeführt.

Die Pipette konnte bis zu ca 2 ml gefüllt und in ca 1/2 sec. wieder entleert werden, d.h. pro "Suspensions"-Vorgang flossen ca 4 ml/sec durch die Öffnung von etwa 1.5 mm Durchmesser.

- Vortex-Schüttler

Hierbei wurden je 2 Analysenröhrchen (mit je 0.5ml Zellsuspension und je 100 μ l TCM-Puffer) zusammen in das Gerät gestellt und 1 min bei Stärke 10 geschüttelt.

Testansatz

Röhrchen Nr.	Zell- susp. (ml)	TCM- Puffer (μ l)	Perchlors. 70 % (μ l)	Stimulationen
1+2	0.5	100		"Spontan"-Release
3+4	0.5		100	100%-Wert
17+18	0.5	100		Pasteur, 30 x
19+20	0.5	100		Pasteur, 10 x
21+22	0.5	100		Vortex, 1 min, Stärke 10

3.5 Osmotische Stimulation

- NaCl 4,3 % und 0,9 %

Je 2 Analysenröhrchen mit 0,5 ml Zellsuspension wurden zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, +4°C) und der Überstand verworfen. Die verbleibenden Zellen wurden mit 0,55 ml NaCl-Lösung aufgefüllt, um wieder die Gesamtfüllmenge von 0,6 ml pro Röhrchen zu erreichen. Auf diese Art und Weise erzielt man eine wesentlich bessere osmotische Stimulation, als wenn man nur 100 µl einer hyper- oder hypoosmolaren Lösung zupipettieren würde. Die Zellen blieben dem osmotischen Reiz bis zur Beendigung aller Experimente ausgesetzt, d.h. 1 - 3 Stunden. Eine 4,1 % NaCl-Lösung hämolysiert 50 % gesunder, menschlicher Erythrozyten (92).

- Aqua dest., Kinetik

Es wurde verfahren wie oben beschrieben, nur mit 0,55ml Aqua dest. Die Inkubationszeiten betrugen je 1, 2, 3, 5, 20 und 30 min. Die Inkubation wurde gestoppt durch Zusatz der gleichen Menge (0,55 ml) 1,8 % NaCl, sodaß wieder isoosmotische Verhältnisse (0,9 % NaCl) herrschten. Bem: In jedem Analysenröhrchen befanden sich statt der üblichen 0,6 ml Füllmenge (bei den anderen Experimenten) nun 1,1 ml Flüssigkeit. Nach Zugabe von 0,5 ml Perchlorsäure 2 % zum Enteiweißen sind die Aqua dest.-stimulierten Proben 1:3 verdünnt (wie der 100 %-Wert) und nicht 1:2 (wie die übrigen Proben). Dies muß bei der Berechnung berücksichtigt werden. (vgl. 2.4)

- Mannit 1, 5, 7,5, 10 %

Auch hier wurden je 2 Analysenröhrchen mit 0,5 ml Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und die verbleibenden Zellen mit 0,55ml der jeweiligen Mannit-Konzentration aufgefüllt. Die Zellen blieben dem osmotischen Reiz ebenso 1 - 3 Stunden* ausgesetzt.

Testansatz

Röhrchen Nr.	Zell- susp. (ml)	TCM-P. (μ l)	Perchl. 70% (μ l)	NaCl in ml		Aqua dest (ml)	Mannit in ml			
				0.9%	4.1%		1%	5%	7.5%	10%
1+2 SR	0.5	100								
3+4 100%	0.5		100							
23+24	0.5*			0.55						
25+26	0.5*				0.55					
27+28	0.5*					0.55				
29+30	0.5*					0.55				
31+32	0.5*					0.55				
33+34	0.5*					0.55				
35+36	0.5*					0.55				
37+38	0.5*						0.55			
39+40	0.5*							0.55		
41+42	0.5*								0.55	
43+44	0.5*									0.55

SR = "Spontan"-Release"

100 = 100%-Wert

* = abzentrifugiert

3.6 Bestrahlung mit UVA 10 J/cm^2 und 20 J/cm^2

Für diese Stimulationsart wurden pro Patient je 3 Analysenröhrchen und je 3 Vertiefungen der Makrotiterplatten (Dreifachwerte!) mit je 0.5 ml Zellsuspension gefüllt. Zu den Röhrchen wurden $100 \mu\text{l}$ TCM-Puffer zupipettiert; in die Vertiefungen der Platten mußten je $200 \mu\text{l}$ TCM-Puffer pipettiert werden, anderenfalls gelang keine gleichmäßige Benetzung des Bodens der Vertiefungen, welcher somit gerade noch mit Flüssigkeit bedeckt war.

In den Platten sollte also die Zellsuspension einer möglichst großen Oberfläche ausgesetzt werden; im Vergleich zu der kleinen Oberfläche in den Röhrchen. Röhrchen und Platten wurden dann in der Lichtabteilung des Hauses mit dem UVA SUN-5000 Gerät bestrahlt. 3 Minuten entsprachen 10 J , 6 Minuten entsprachen 20 J/cm^2 ; diese Werte galten für einen Abstand der Proben von der Lichtröhre von 40 cm. Die Röhrchen blieben immer unverschlossen; die Platten wurden dagegen mit ihrem Deckel verschlossen und nur für die Bestrahlungszeitdauer geöffnet. Alle in dem Bestrahlungsraum befindlichen Proben wurden vor und nach Bestrahlung mit Tüchern abgedeckt, um Einwirkung von Streustrahlung zu vermeiden. Während der Bestrahlung entstand auch Wärme; im Bestrahlungsfeld, in dem sich die Proben befanden, wurden bis zu $+ 40^\circ \text{C}$ gemessen.

Sollten die Zellsuspensionen von 4 Patienten bestrahlt werden, so dauerte dies für alle Proben (Analysenröhrchen + Platten) etwa 15-20 min; wenn zusätzlich noch β -Glucuronidase bestimmt wurde, etwa 25-30 min. So lange befanden sich also die Zellen im Bestrahlungsraum der Lichtabteilung, sie wurden anschließend wieder in das Allergielabor gebracht und dort abschließend zentrifugiert; die Röhrchen wieder bei 1200 U/min bei $+4^\circ \text{C}$, die Platten ebenfalls bei 1200 U/min in der im Labor befindlichen Plattenzentrifuge. Dieses Gerät konnte nicht gekühlt werden. Insgesamt betrug die Gesamt-Experimentierzeit auch hier 1-3 Stunden.

Bei einigen Patienten wurde neben Histamin auch β -Glucuronidase und LDH bestimmt.

Testansatz

Röhrchen Platten Nr.	Zell- susp. (ml)	TCM- Puffer (μ l)	Perchl. 70% (μ l)	Triton X 3% (μ l)	Stimulationen
1+2+3	0.5	100			SR
4+5+6	0.5		100		100%-Wert
45+46+47	0.5	100			Rö UVA 10J/cm ²
48+49+50	0.5	100			Rö UVA 20J/cm ²
51+52+53	0.5	200			P1 UVA 10J/cm ²
54+55+56	0.5	200			P1 UVA 20J/cm ²
57+58+59	0.5	100			SR
60+61+62	0.5			100	100%-Wert
63+64+65	0.5	100			Rö UVA 10J/cm ²
66+67+68	0.5	100			Rö UVA 20J/cm ²
69+70+71	0.5	200			P1 UVA 10J/cm ²
72+73+74	0.5	200			P1 UVA 20J/cm ²

Bis einschließlich Nr.56: Histaminbestimmung

Nr.57 bis Ende : β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung

Röhrchen, Platten: Die Nummern beziehen sich auf die einzelnen Analysenröhrchen und Plattenvertiefungen

SR = "Spontan"-Release

Rö = Röhrchen

Pl = Platten.

Aus dem Schema des Testansatzes ist ersichtlich, daß für die β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung dieselben Reaktionsgefäße verwendet wurden. Nach Beendigung der Experimente wurden diese Röhrchen und Platten zentrifugiert (genauso wie für die Histaminbestimmung, nämlich bei 1200 U/min) und anschließend je 0.2 ml des Überstandes zur Bestimmung von β -Glucuronidase und LDH benutzt. (vgl. 4.)

Bemerkung zur Berechnung der Histaminkonzentration: Da zu der Zellsuspension von 0.5 ml in den Platten 200 μ l TCM-Puffer pipettiert wurden, befanden sich in jeder Plattenvertiefung 0.7 ml und nicht 0.6 ml, wie in den Röhrchen. Die Zellsuspension in den Platten war also etwas verdünnter; deshalb wurde die Histaminkonzentration in ng/ml hier mit dem Faktor 1.17 multipliziert. Dieser ergab sich folgendermaßen:

Röhrchen: Verhältnis Gesamtflüssigkeitsmenge/

$$\text{Menge der Zellsuspension} = 6/5$$

Platten: Verhältnis Gesamtflüssigkeitsmenge/

$$\text{Menge der Zellsuspension} = 7/5$$

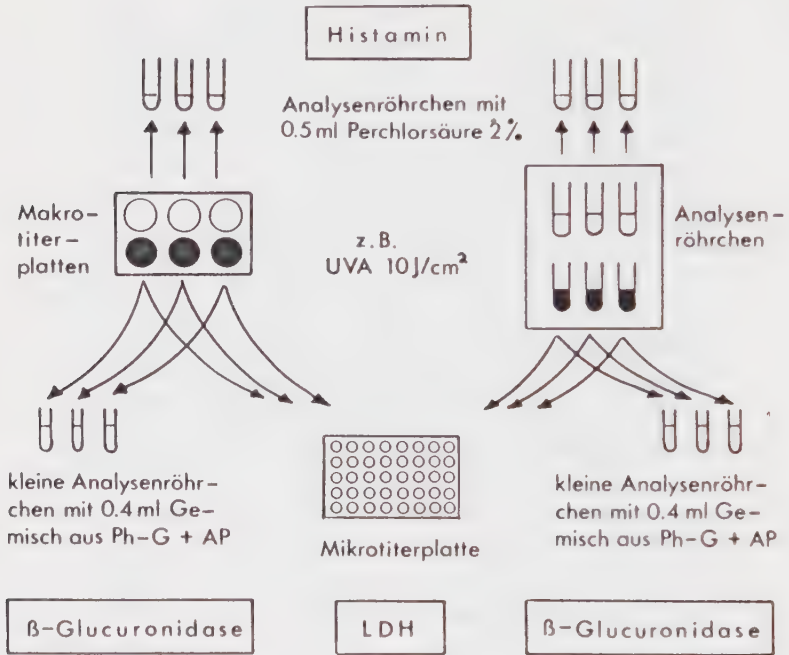
$$6/5 \times 1.17 = 7/5$$

4. Freisetzung von β -Glucuronidase und LDH

Diese Untersuchungen wurden nur bei der Bestrahlung mit UVA 10J und 20J/cm² durchgeführt. Von 56 Patienten, deren Zellen bestrahlt wurden, wurde bei 24 Patienten zusätzlich zur Histaminbestimmung eine β -Glucuronidase-Bestimmung durchgeführt und von diesen wiederum bei 7 Patienten zusätzlich LDH bestimmt.

Für die Herstellung der Leukozyten-Suspension und die Durchführung der Experimente gilt alles für die Histaminfreisetzung bereits Gesagte, (vgl. 2.1 und 2.2), zusätzlich gelten die methodischen Besonderheiten der Bestrahlungsexperimente, welche in Kap.3.6 beschrieben sind. Das zugehörige Pipettierschema umfaßt auch β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden Platten und Röhrchen zentrifugiert (1200 U/min) und der Überstand von 0.55ml für die Bestimmung von Histamin, β -Glucuronidase und LDH verwendet.

Verteilung des Überstandes für die Bestimmung von Histamin, β -Glucuronidase und LDH am Beispiel eines Patienten:



Aus dem Schema ist ersichtlich, daß für die Dosen UVA 10J (und 20J) jeweils in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten bestrahlt wurde und daß Dreifachwerte bestimmt wurden. Die schwarz gefärbten Reaktionsgefäße sollen die Überstände kennzeichnen (0.55ml), die für β -Glucuronidase und LDH verwendet wurden. Hiervon wurden je 0.2 ml in kleine Analysenröhrchen (β -Glucuronidase) und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (LDH) pipettiert. Die im Schema farblosen Überstände waren für die Histaminbestimmung vorgesehen.

4.1 β -Glucuronidase-Bestimmung

Die β -Glucuronidase gehört zu den sauren Hydrolasen, welche in den azurophilen Granula besonders der neutrophilen Granulozyten enthalten sind. Sie dienen hauptsächlich der intrazellulären Verdauung, werden jedoch auch extrazellulär freigesetzt durch Einwirkung von Komplement oder bestimmten chemotaktischen Faktoren (53). Die Extrusion dieses Enzyms ist ein Zeichen aktiver Zelleistung.

In der vorliegenden Untersuchung wurde versucht, dies durch Bestrahlung mit UVA 10J und 20J/cm² zu stimulieren. Wie in dem vorstehenden Schema bereits gezeigt, wurden 0.2 ml des Überstandes mit einem Gemisch aus 0.05 ml glucuronisiertem Phenolphthalein und 0.35 ml Acetatpuffer (pH=4,5) versetzt und anschließend über Nacht bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach 12 Stunden wurden 1,7 ml Glycinpuffer zugegeben (pH 10.2-10.45) und anschließend das hydrolysierte Phenolphthalein in alkalischen Milieu bestimmt. Dies geschah photometrisch, wobei ein Hg 560 mm-Filter verwendet wurde. Die durch Stimulation mit Triton X 100 2 % erreichte Zellzerstörung ergab den 100 %-Wert (vgl. Schema Kapitel 3.6).

Bei der β -Glucuronidase-Bestimmung wurden ebenfalls Dreifachwerte angesetzt und der Mittelwert daraus in % vom 100 %-Wert berechnet. Wenn der Leerwert oder "Spontan"-Release abgezogen wurde, wird dies, ebenso wie bei der Histaminbestimmung, gesondert angegeben.

4.2 LDH-Bestimmung

Im Gegensatz zu β -Glucuronidase als lysosomales Enzym stellt LDH ein zytoplasmatisches Markerenzym dar. Seine Freisetzung beruht nicht auf einer aktiven Leistung der Zelle, sondern lediglich auf deren Zerstörung.

Mit der LDH-Bestimmung sollte also geprüft werden, inwieweit Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm² die Vitalität der Granulozyten beeinflusste, bzw. ob eine β -Glucuronidase-Freisetzung als aktive Zelleistung oder als Folge einer Zellzerstörung zu bewerten war. Umgekehrt wird bei einer rein lysosomalen Enzymextrusion kein LDH freigesetzt. (53)

Die LDH-Bestimmung erfolgte enzymatisch ("Test-Combination LDH opt." Böhlinger Mannheim) nach folgendem Prinzip:



Die Extinktionsabnahme des NADH wurde photometrisch gemessen mit einem Hg 365 nm-Filter. Nach Zugabe der Probe (jeweils 50 μ l aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte) zum Reaktionsgemisch wurde die Extinktion 3 mal abgelesen, jeweils im Abstand von 3 min. Ein dem Enzymmeßplatz zugeordneter Rechner bildete aus den Extinktionsdifferenzen die Mittelwerte, welche als Grundlage zur Berechnung der U/l dienten. Auch hier wurden die durch Stimulation mit Triton X 100 2% erreichten Werte gleich 100% gesetzt und die übrigen Stimulationswerte (ebenfalls Dreifachwerte) in % von 100% ausgedrückt. Leerwertabzug ("Spontan"-Release) wird gesondert aufgeführt.

4.3 Reagentien und Material zur β -Glucuronidase- und LDH- Bestimmung.

β -Glucuronidase:

kleine Analysenröhrchen aus Polystyrol	(Greiner München) 10 x 40 mm Zur Inkubation der Proben mit dem Gemisch aus Phen- olphthalein- Glucuronid und Acetat-Puffer.
Phenolphthalein-Glucuronid Best.Nr.p 0376	Als Natrium-Salz, aus Ka- ninchen-Urin gewonnen. (Sigma, Deisenhofen)
Acetat-Puffer	Für 0.1 molare Lösung mit pH 4.5: 4.1 g Na-Acetat, wasser- frei 3.25 ml Eisessig 500 ml Aqua dest.
Glycin-Puffer	Für 1 molare Lösung : 16.3 g Glycin 12.65 g NaCl mit konzentrierter Natron- lauge (12 ml) auf pH 10.7 einstellen 3.5 ml Glycin-Puffer+ 1ml Acetat-Puffer muß einen pH zwischen 10.2 und 10.45 ergeben.

LDH:

Mikrotiterplatten

(Greiner, München)

Als Behälter der Proben
vor der LDH-Bestimmung

Test-Combination LDH-opt.
Best.Nr.124907

(Böhringer Mannheim GmbH
Diagnostica)

In der vorliegenden Untersuchung wurde jeweils die Hälfte der angegebenen Menge der Reagentien verwendet und demnach die Reaktion auch mit der halben vorgeschlagenen Probenmenge gestartet.

(statt 100 μ l 50 μ l)

Eppendorf-Enzym-Meßplatz

Bestehend aus:

- Photometer mit Küvettenwagen, wobei 6 Küvetten automatisch 3 mal im Abstand von 1 min. abgelesen werden.
- Rechner: bildet Mittelwert aus obigen Extinktionsdifferenzen
- Drucker

Statistische Auswertung

Zum Vergleich und zur Prüfung der Meßergebnisse wurden folgende statistische Verfahren angewendet:

- 1.) WILCOXON - Test für paarig angeordnete Beobachtungen
(innerhalb eines Kollektivs;
z.B. Vergleich SR / UVA 10J/cm²)
- 2.) "U-Test" von WILCOXON, MANN und WHITNEY für unabhängige Stichproben.
(Vergleich verschiedener Kollektive, z.B. für UVA 10J/cm² Vergleich Normalpersonen / Patienten mit atopischen Erkrankungen)

Beide Tests sind verteilungsunabhängig, im Gegensatz zum parametrischen Student's T-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte stetiger Verteilungen. Diese Stetigkeitsannahme ist in der Praxis strenggenommen nie erfüllt.

Bei beiden Tests wurden folgende Signifikanz-Niveaus bestimmt:

Für den WILCOXON-Test gilt:

$p = 0.05$ = Wahrscheinlichkeit von 95 %, daß eine Aussage über das Verhalten zweier Beobachtungen zueinander zutrifft.

$p = 0.01$ = Wahrscheinlichkeit von 99 %

$p = 0.001$ = Wahrscheinlichkeit von 99.9 %

Für den U-Test gilt:

$\alpha = 0.05$ = Wahrscheinlichkeit von 95 %

$\alpha = 0.01$ = Wahrscheinlichkeit von 99 %

$\alpha = 0.001$ = Wahrscheinlichkeit von 99.9 %

$p, \alpha = 0.05$ gilt als nicht signifikant.

Außerdem wurden bei allen Beobachtungen folgende Berechnungen angestellt:

- Mittelwert $\bar{x}$
- Standardabweichung S
- Mittlerer Fehler des Mittelwertes SEM

Diese bilden die Grundlage zur graphischen Darstellung der Ergebnisse.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\pm S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}}$$

$$SEM = \frac{\sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}}}{\sqrt{n}}$$

Anmerkung zur graphischen Darstellung:

SEM wird als Balken über den Säulen angegeben.

* = p, Alpha = 0.05

** = p, Alpha = 0.01

*** = p, Alpha = 0.001

ERGEBNISSE :

1. Anti -IgE - induzierte Histaminfreisetzung

1.1 Patienten und Methoden

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Konzentration von Anti-IgE 10^{-2} im TCM-Puffer verwendet. (107) 100 μ l dieser Lösung wurden zu je 0.5 ml Zellsuspension pipettiert. Die Stimulation mit Anti-IgE wurde an Serien von insgesamt 105 Patienten durchgeführt. Sie lassen sich in folgende Kollektive einteilen:

- 61 Normalpersonen = N
- 24 Patienten mit atopischen Erkrankungen = A
(Nr. 1- 24) Hiervon:
 - 16 Patienten ohne atopisches Ekzem = A(-E)
 - 8 Patienten mit atopischem Ekzem = AE
(Nr. 2, 10, 12, 14 17, 21, 22, 23)
- 9 Patienten mit Urtikaria = U
(Nr. 29 - 37)
- 6 Patienten mit Photodermatosen = Ph
(Nr. 38 - 42, Nr. 23)
- 3 Patienten mit Allergie gegen Bienen- und Wespengift (Nr. 26 - 28) = Bi/We
- 2 Patienten mit allergischem Kontaktekzem = All.KE
(Nr. 44 + 45)
- 1 Patient mit Insektengiftallergie = I.All
(Nr. 47)

Die letztgenannten drei Patientengruppen wurden wegen der geringen Patientenzahl im Vergleich zum Gesamtkollektiv nicht in die graphische Darstellung einbezogen.

Bemerkung: Eine Patientin (Nr. 23) hatte sowohl ein ato-

gisches Ekzem, als auch eine histologisch gesicherte polymorphe Lichtdermatose. Sie ist daher gleichzeitig im Kollektiv der Patienten mit atopischem Ekzem (AE), als auch im Kollektiv der Patienten mit Photodermatosen (Ph) vertreten. Dies scheint gerechtfertigt, da bei der statistischen Auswertung kein Vergleich von AE mit Ph vorgenommen wurde, sondern lediglich jeweils ein Vergleich mit dem Normalkollektiv.

Neben den bereits aufgeführten Abkürzungen für die Patientenkollektive gilt folgende allgemeine Abkürzungsliste:

Histamin - Release	= HR
"Spontan"-Release	= SR
100 % - Wert, freisetzbare Gesamtmenge von Histamin, β -Glucuronidase oder LDH.	= 100 %
Anti - IgE 10^{-2}	= a-IgE
Ca - Ionophore	= Ion.
30-malige Suspension mittels Pasteur-pipette	= P30
10-malige Suspension mittels Pasteur-pipette	= P10
Vortex - Genie - Schüttler, 1 min bei Stärke 10	= Vo
Analysenröhrchen	= Rö
Makrotiterplatten	= P1

1.2 Fragestellungen

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit die Werte der Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} den "Spontan"-Release, d.h. die spontane Histaminfreisetzung ohne jegliche Stimulation übersteigen:

a) Vergleich:

"Spontan"-Release mit Anti-IgE-induziertem HR

jeweils bei A, A(-E), AE, U, Ph.

Da der "Spontan"-Release Teil des Vergleiches ist, kann er nicht von den Stimulationswerten mit Anti-IgE subtrahiert werden.

Des weiteren wurde untersucht, ob sich bei der Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven (A, A(-E), AE, U, Ph) gegenüber dem Normalkollektiv (N) ergaben.

Um festzustellen, ob die Höhe des "Spontan"-Release hierbei von Bedeutung ist, wurde zusätzlich der Unterschied zwischen dem "Spontan"-Release der Patientenkollektive gegenüber dem des Normalkollektivs bestimmt:

b) Vergleich:

"Spontan"-Release

N mit A

Anti-IgE 10^{-2} -induzierter HR

N mit A(-E)

N mit AE

N mit U

N mit Ph

Von den Stimulationswerten mit Anti-IgE wurden die Werte des "Spontan"-Release subtrahiert. Wenn (in seltenen Fällen) bei der Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten mit Anti-IgE negative Werte resultierten, wurden sie gleich Null gesetzt.

Bemerkung: Da die Patientenkollektive mit Insektengiftallergie und All.KE eine zu geringe Patientenzahl aufwiesen, konnten sie nicht statistisch ausgewertet werden.

den. Tabellen mit Mittelwerten, Standardabweichung und Mittelwert der Standardabweichung wurden jedoch aufgeführt.

HR = Histamin-Release

1.3 Ergebnisse

Zu a.) Anti-IgE induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release.

Bei allen Kollektiven fand sich eine gegenüber dem "Spontan"-Release signifikant erhöhte Histaminfreisetzung bei Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} (zwischen 22.7 und 34.6 % der Gesamt-Freisetzung).

Die Wahrscheinlichkeit liegt hierbei bei den Kollektiven mit hohen Patientenzahlen bei $p = 0.001$ (N, A, A(-E)), bei den Kollektiven mit weniger Patienten bei $p = 0.01$ (AE, U) bzw. bei $p = 0.05$ (Ph).

Die Höhe der Mittelwerte (M), der Standardabweichung (+ S) und der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) ist tabellarisch angegeben.

Zu b.) "Spontan"-Release und Anti-IgE - induzierte Histaminfreisetzung bei den Patientenkollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv.

Die Werte des "Spontan"-Release der verschiedenen Patientenkollektive ergaben in allen Fällen keinen signifikanten Unterschied zu den Werten des "Spontan"-Release des Normalkollektivs (7.6 %); allerdings deutete sich im Vergleich der Werte von Patienten mit atopischem Ekzem zu anderen Atopikern und zu Normalpersonen ein Trend zu erhöhtem Histamin-Release an. (AE = 12,8 %, A(-E) = 5,1%), der die statistische Signifikanz knapp verfehlte.

Die Wahrscheinlichkeit beim Vergleich N/AE lag bei $p = 0.1$ (N = 7.6; AE = 12.8%), dies wird jedoch nicht mehr als signifikant angesehen. (vgl. Statistikteil). Ebenso verhielt es sich bei der Stimulation mit

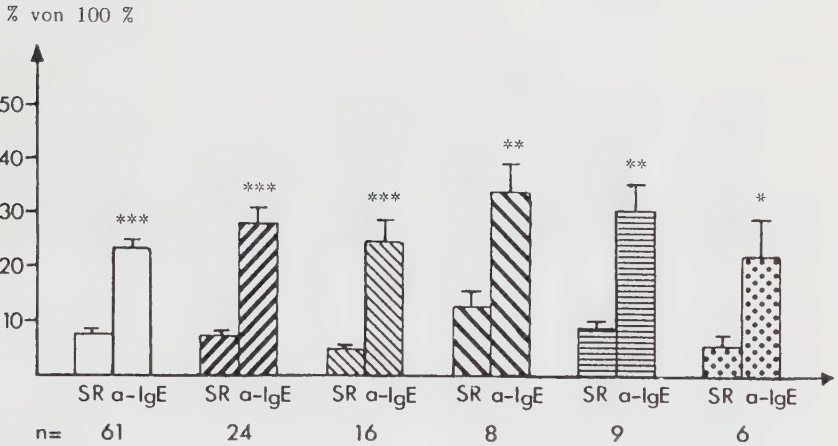
Anti-IgE 10^{-2} : Die Werte der Patientenkollektive zeigten keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Normalkollektiv.

Tabelle 1: Zu a. Anti-IgE-induzierte Histaminfreisetzung
im Vergleich zum "Spontan"-Release
bei verschiedenen Erkrankungen

Patienten	N n=61	A n=24	A(-E) n=16	AE n=8	U n=9	Ph n=6
	SR a-IgE	SR a-IgE	SR a-IgE	SR a-IgE	SR a-IgE	SR a-IgE
M	7.6 23.4	7.7 28.3	5.1 25.1	12.8 34.6	9.4 31.2	6.2 22.7
+S	6.4 14.2	6.3 15.8	2.2 15.4	8.6 15.6	4.3 15.6	5.3 16.5
SEM	0.8 1.8	1.3 3.2	0.5 3.9	3.1 5.5	1.4 5.2	2.2 6.8
p=	0.001	0.001	0.001	0.01	0.01	0.05

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung
angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.1: Zu a. Anti-IgE-induzierte Histaminfreisetzung
im Vergleich zum "Spontan"-Release
bei verschiedenen Erkrankungen



SR = "Spontan"-Release
n = Anzahl der Patienten

a-IgE = Anti-IgE 10^{-2}

N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

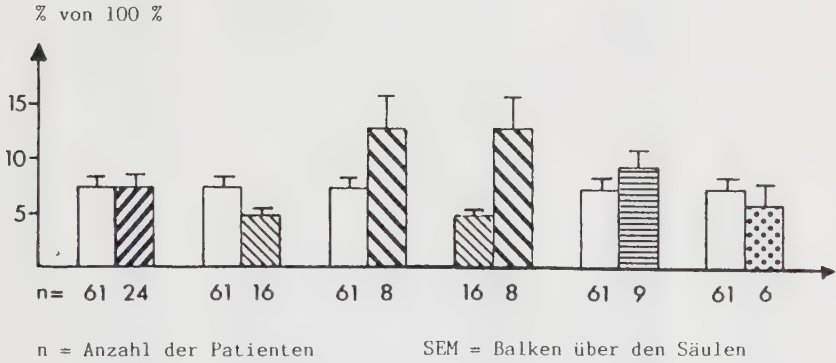
*** = p, alpha = 0.001

Tabelle 2: Zu b. Histamin-"Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Patienten	N n=61	A n=24	N n=61	A(-E) n=16	N n=61	AE n=8
M	7.6	7.7	7.6	5.1	7.6	12.8
+S	6.4	6.3	6.4	2.2	6.4	8.6
SEM	0.8	1.3	0.8	0.5	0.8	3.1
alpha=	n.s.		n.s.		0.1 (n.s.)	
Patienten	A(-E) n=16	AE n=8	N n=61	U n=9	N n=61	Ph n=6
M	5.1	12.8	7.6	9.4	7.6	6.2
+S	2.2	8.6	6.4	4.3	6.4	5.3
SEM	0.5	3.1	0.8	1.4	0.8	2.2
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben.

Abb. 2: Zu b. Histamin-"Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv



N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

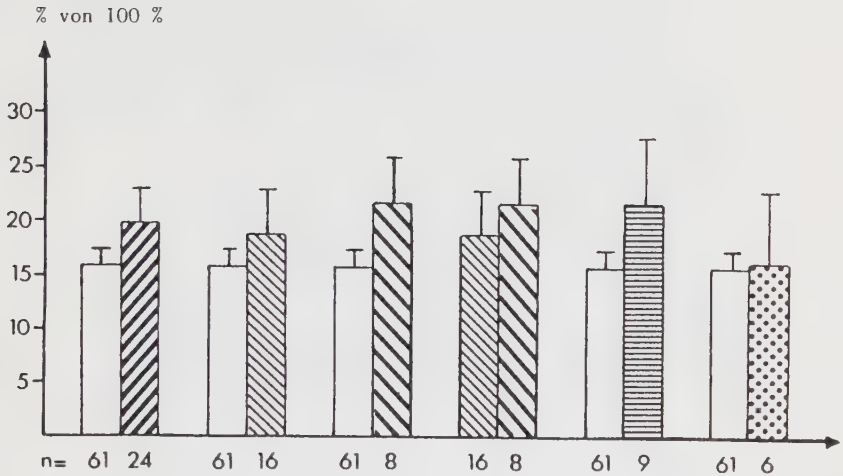
AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

Tabelle 3: Zu b. Anti-IgE-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Patienten	N n=61	A n=24	N n=61	A(-E) n=8	N n=61	AE n=8
M	16.0	20.0	16.0	19.2	16.0	21.8
+S	12.3	14.1	12.3	15.5	12.3	11.5
SEM	1.6	2.9	1.6	3.9	1.6	4.1
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	
Patienten	A(-E) n=16	AE n=8	N n=61	U n=9	N n=61	Ph n=6
M	19.2	21.8	16.0	21.8	16.0	16.5
+S	15.5	11.5	12.3	17.4	12.3	16.0
SEM	3.9	4.1	1.6	5.8	1.6	6.5
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.3: Zu b. Anti-IgE-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Kollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv



n = Anzahl der Patienten

SEM = Balken über den Säulen



N = Normalpersonen



A = Patienten mit atopischen Erkrankungen



A(-E) = Atopiker ohne Ekzem



AE = Patienten mit atopischem Ekzem



U = Patienten mit Urtikaria



Ph = Patienten mit Photodermatosen

Tabelle 4: "Spontan"-Release und Anti-IgE-induzierte Histaminfreisetzung bei sonstigen allergischen Erkrankungen.

Patienten	Bi/We n = 3		All.KE n = 2		I.All. n = 1	
	SR	a-IgE	SR	a-IgE	SR	a-IgE
M	5.2	43.7	8.9	23.1	5.5	34.3
+S	2.9	10.2	2.0	17.8		
SEM	1.7	5.9	1.5	12.6		

Bi/We: Allergie gegen Bienen- und Wespengift

All.KE: Allergisches Kontaktekzem

I.All: Insektengiftallergie (ungeklärter Genese)

Bem: Keine Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten.

Es fällt auf, daß die Patienten mit Allergie gegen Bienen- und Wespengift die höchste Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} aufwiesen.

2. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung

2.1 Patienten und Methoden

Die Stimulation mit Ca²⁺-Ionophore 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} g/l wurde an Leukozyten-Suspensionen von insgesamt 93 Patienten durchgeführt, welche sich in folgende Kollektive einteilen lassen:

- 52 Normalpersonen = N
- 22 Patienten mit atopischen Erkrankungen = A
(Nr. 1 - 24, außer Nr. 11 + 22)
Hiervon:
 - 15 Patienten ohne atopisches Ekzem = A(-E)
 - 7 Patienten mit atopischem Ekzem = AE
(Nr. 2, 10, 12, 14, 17, 21, 23)
- 9 Patienten mit Urtikaria = U
(Nr. 29 - 37)
- 5 Patienten mit Photodermatosen = Ph
(Nr. 38, 40, 41, 42, 23)
- 3 Patienten mit Allergie gegen Bienen- und Wespengift (Nr. 26 - 28) = Bi/We
- 2 Patienten mit allergischem Kontaktekzem = All.KE
(Nr. 44 + 45)
- 1 Patient mit Insektengiftallergie (Nr. 47)

Bei allen diesen Patienten wurde auch eine Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} durchgeführt. Es gelten daher auch die gleichen Anmerkungen:

- die drei letztgenannten Kollektive wurden wegen der geringen Patientenzahl nicht in die graphische Darstellung aufgenommen und auch nicht statistisch ausgewertet. Tabellen mit Mittelwerten und Standardabweichung wurden jedoch auch hier erstellt.

- Eine Ausnahme bilden die Patienten mit Photodermatosen, welche mit $n = 5$ knapp unter der Grenze für die statistische Auswertbarkeit im WILCOXON-Test ($n = 6$) liegen. Zur Veranschaulichung wurden ihre Werte trotzdem graphisch dargestellt, wenngleich eine statistische Auswertung nur im Vergleich mit einem anderen Kollektiv (Normalkollektiv) mit dem U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY möglich war.
- Patientin Nr. 23 litt sowohl unter einem atopischen Ekzem, als auch unter einer polymorphen Lichtdermatose. Sie ist daher, wie bei der Stimulation mit Anti-IgE, sowohl im Kollektiv der Patienten mit atopischem Ekzem (AE), als auch bei den Patienten mit Photodermatosen (Ph) aufgeführt. Statistisch wird auch hier keine Beziehung zwischen diesen beiden Kollektiven hergestellt.

2.2 Fragestellungen:

Sie sind im wesentlichen identisch mit denen der Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2}

Auch hier interessierte zuerst die Höhe der Stimulationswerte mit Ca -Ionophore 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} im Vergleich zum "Spontan"-Release ohne Stimulation. Dies wurde bei beiden einzelnen Kollektiven für jede Konzentrationsstufe bestimmt:

a) Vergleich:

"Spontan"-Release mit Ca -Ionophore 10^{-3} induziertem HR
 "Spontan"-Release mit Ca -Ionophore 10^{-4} induzierten HR
 "Spontan"-Release mit Ca -Ionophore 10^{-5} induzierten HR
 jeweils bei N, A, A(-E), AE, U.

Der "Spontan"-Release wurde hierbei von den Stimulationswerten nicht subtrahiert.

Ebenso wurde untersucht, wie sich "Spontan"-Release und Stimulationswerte der Patientenkollektive gegenüber den Werten des Normalkollektivs verhalten. Auch dies wurde für jedes Kollektiv und jede Konzentration von Ca²⁺-Ionophore einzeln ausgewertet:

b) Vergleich:

"Spontan"-Release	N mit A
Ca ²⁺ -Ionophore 10 ⁻³ induzierter HR	N mit A(-E)
Ca ²⁺ -Ionophore 10 ⁻⁴ induzierter HR	N mit AE
Ca ²⁺ -Ionophore 10 ⁻⁵ induzierter HR	N mit U
	N mit Ph *

Die Werte des "Spontan"-Release wurden von den Werten der Stimulation mit Ca²⁺-Ionophore subtrahiert. Zusätzlich ergibt sich noch eine Möglichkeit der statistischen Auswertung, nämlich ob sich bei den einzelnen Kollektiven die Werte der verschiedenen Konzentrationen von Calcium - Ionophore signifikant voneinander unterscheiden, d.h. ob eine Dosisabhängigkeit nachweisbar ist:

c) Vergleich:

Ca²⁺-Ionophore 10⁻³ mit 10⁻⁴-induziertem HR.
 Ca²⁺-Ionophore 10⁻⁴ mit 10⁻⁵-induziertem HR
 jeweils bei N, A, A(-E), AE, U.

Von den Stimulationswerten wurden die Werte des "Spontan"-Release abgezogen. Wenn hierbei (in seltenen Fällen) negative Werte resultierten, wurden diese gleich Null gesetzt.

*: bei dieser Fragestellung (Vergleich verschiedener Kollektive mit dem U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY) ist trotz der geringen Patientenzahl (n=5) eine statistische Auswertung möglich.

HR = Histamin-Release

2.3 Ergebnisse:

zu a.) Ca - Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

Bei den Kollektiven der Normalpersonen, der Patienten mit atopischen Erkrankungen, insbesondere derjenigen ohne atopisches Ekzem, sowie der Patienten mit Urtikaria waren die durchschnittlichen Stimulationswerte mit Ca - Ionophore gegenüber dem "Spontan"-Release signifikant erhöht. Dies galt für alle drei Konzentrationen: Calcium - Ionophore 10^{-3} : 41.5 - 66.2 %, 10^{-4} : 9.9 - 22.7 %, 10^{-5} : 7.4 - 17.5 % der Gesamt-Histaminfreisetzung.

Zu b) "Spontan"-Release und Ca Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.

Die Werte des "Spontan"-Release der verschiedenen Patientenkollektive (N, A, A(-E), AE, U, Ph) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu denen des Normalkollektivs mit 7.9 %. Lediglich die Patienten mit atopischen Erkrankungen ohne Ekzem wiesen mit 5 % deutlich niedrigere Werte auf als die Normalpersonen, bei einer Wahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.1$. Dies wird jedoch nicht mehr als signifikant angesehen.

Beim Vergleich der beiden Kollektive der Atopiker mit und ohne Ekzem fand sich ein signifikant erhöhter "Spontan"-Release der Patienten mit Ekzem. (A(-E)= 5 %, AE= 12 %, $\alpha = 0.05$)

Bei den Patienten mit Urtikaria war der "Spontan"-Release mit 9.4 % gegenüber dem Normalkollektiv etwas erhöht, jedoch nicht signifikant. Die Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Ca - Ionophore in allen drei Konzentrationen ergab bei sämtlichen Patientenkollektiven bis auf eine Ausnahme keinen signifikanten Unterschied zu den Normalpersonen. Die Werte der Patienten mit atopischen Erkrankungen, insbesondere derjenigen ohne Ekzem, lagen höher

als die der Normalpersonen; für Ca -Ionophore 10^{-3} ergab sich dabei mit 52.9 % bei A und 52.6 % bei A(-E) gegenüber N mit 46.9 % eine Wahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.1$ (nicht signifikant).

Die Werte der Patienten mit Urtikaria waren bei Stimulation mit Ca -Ionophore 10^{-3} deutlich niedriger (32.1 %, $\alpha = 0.1$), bei Ca -Ionophore 10^{-4} und 10^{-5} deutlich höher als die der Normalpersonen ($U = 10.4$ %, $N = 5.5$ %, $\alpha = 0.1$ und $U = 8.5$ %, $N = 3.1$ % $\alpha = 0.05$).

Für die Konzentration Ca -Ionophore 10^{-5} ist dies signifikant.

Zu c) Ca - Ionophore induzierte Histaminfreisetzung

Vergleich verschiedener Konzentrationen.

Bei der Gegenüberstellung der Histaminfreisetzung nach Ca Ionophore-Stimulation der Konzentrationen 10^{-3} und 10^{-4} fanden sich bei der geringeren Konzentration bei allen Kollektiven (N, A, A(-E), AE, U) signifikant verminderte Werte.

Bei den Kollektiven mit hohen Patientenzahlen (N, A, A(-E)) ergaben sich mit Freisetzungswerten von 5.5 % - 9.5 % bei Ca -Ionophore 10^{-4} Signifikanzniveaus von $p = 0.001$; bei den Kollektiven mit niedrigen Patientenzahlen (AE, U) Signifikanzniveaus von $p = 0.05$.

Die Freisetzung bei Konzentration 10^{-4} betrug 10.29 % (AE) und 10.4 % (U).

Der Vergleich der Konzentrationen von Ca -Ionophore 10^{-4} und 10^{-5} zeigte nahezu identische Ergebnisse: Auch hier war die Abnahme der Histaminfreisetzung bei Ca -Ionophore 10^{-5} signifikant mit Freisetzungsraten von 2.48 - 3.07 %, bis auf die Patienten mit Urtikaria.

Hiermit ist eine Dosisabhängigkeit der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Ca -Ionophore 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} nachgewiesen.

Tabelle 5: Zu a. Ca -Ionophore- induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen.

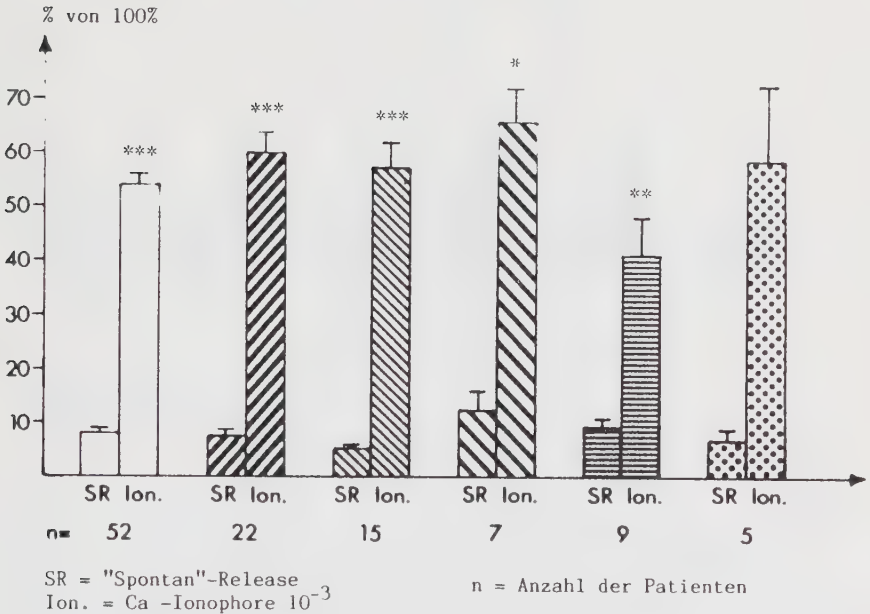
Ca -Ionophore 10^{-3}

Patienten	N n=52		A n=22		A(-E) n=15		AE n=7		U n=9		Ph n=5	
	SR	Ca-Ion. 10^{-3}	SR	Ca-Ion. 10^{-3}	SR	Ca-Ion. 10^{-3}	SR	Ca-Ion. 10^{-3}	SR	Ca-Ion. 10^{-3}	SR	Ca-Ion. 10^{-3}
M	7.9	54.3	7.4	60.3	5.0	57.5	12.6	66.2	9.4	41.5	7.3	59.3
+S	6.2	13.9	6.4	17.9	2.2	17.9	9.3	17.6	4.3	21.8	5.1	31.5
SEM	0.9	1.9	1.4	3.8	0.6	4.6	3.5	6.7	1.4	7.3	2.3	14.1
p=	0.001		0.001		0.001		0.05		0.01			

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.5: Zu a. Ca -Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen.

Ca -Ionophore 10^{-3}



- N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

- AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Tabelle 6: Zu a. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen.

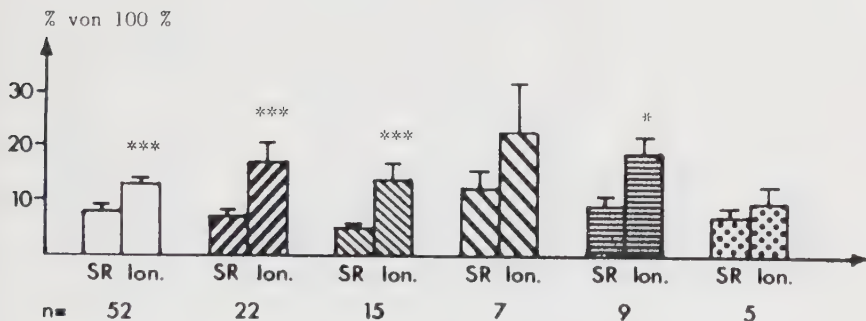
Ca²⁺-Ionophore 10⁻⁴

Patienten	N n=52		A n=22		A(-E) n=15		AE n=7		U n=9		Ph n=5	
	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁴	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁴	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁴	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁴	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁴	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁴
M	7.9	13.2	7.4	16.9	5.0	14.1	12.6	22.7	9.4	19.3	7.3	10.0
+S	6.2	8.4	6.4	16.7	2.2	11.8	9.3	24.4	4.3	8.9	5.1	7.3
SEM	0.9	1.2	1.4	3.6	0.6	3.0	3.5	9.2	1.4	3.0	2.3	3.3
p=	0.001		0.001		0.001		n.s.		0.05			

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.6: Zu a. Ca -Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen.

Ca -Ionophore 10^{-4}



n = Anzahl der Patienten

SR = "Spontan"-Release

Ion. = Ca -Ionophore 10^{-4}

- N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

- AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Tabelle 7: Zu a. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

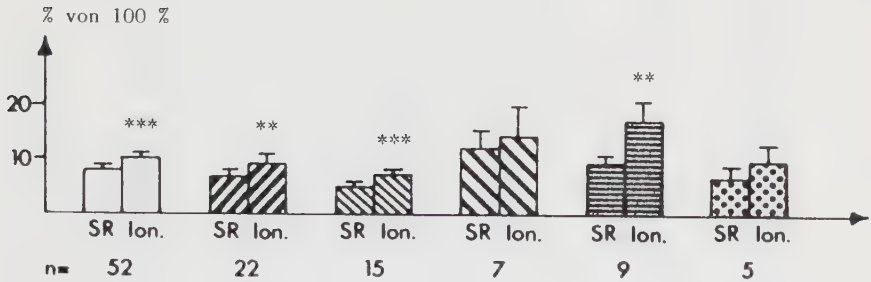
Ca²⁺-Ionophore 10⁻⁵

Patienten	N n=52		A n=22		A(-E) n=15		AE n=7		U n=9		Ph n=5	
	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁵	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁵	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁵	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁵	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁵	SR	Ca-Ion. 10 ⁻⁵
M	7.9	10.3	7.4	9.7	5.0	7.4	12.6	14.6	9.4	17.6	7.3	9.8
+S	6.2	7.6	6.4	9.3	2.2	3.3	9.3	15.5	4.3	11.2	5.1	7.3
SEM	0.9	1.1	1.4	2.0	0.6	0.8	3.5	5.8	1.4	3.7	2.3	3.3
p=	0.001		0.01		0.001		n.s.		0.01			

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb. 7: Zu a. Ca -Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen.

Ca -Ionophore 10^{-5}



n = Anzahl der Patienten

SR = "Spontan"-Release

Ion. = Ca Ionophore 10^{-5}



N = Normalpersonen



A = Patienten mit atopischen Erkrankungen



A(-E) = Atopiker ohne Ekzem



AE = Patienten mit atopischem Ekzem



U = Patienten mit Urtikaria



Ph = Patienten mit Photodermatosen

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = P, alpha = 0.001

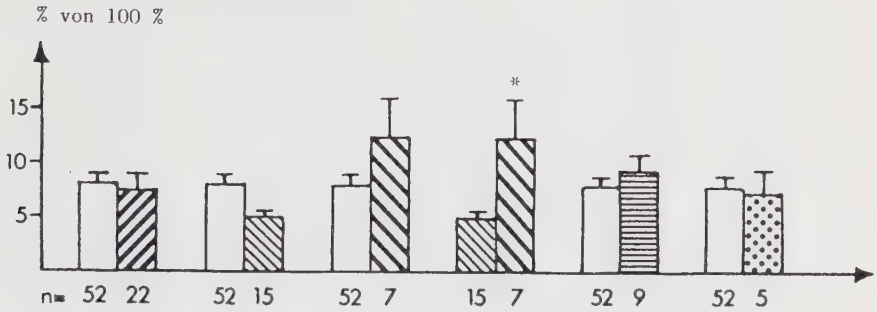
Tabelle 8: Zu b. "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Patienten	N n=52	A n=22	N n=52	A(-E) n=15	N n=52	AE n=7
M	7.9	7.4	7.9	5.0	7.9	12.6
+S	6.2	6.4	6.2	2.2	6.2	9.3
SEM	0.9	1.4	0.9	0.6	0.9	3.5
alpha=	n.s.		0.1 (n.s.)		n.s.	

Patienten	A(-E) n=15	AE n=7	N n=52	U n=9	N n=52	Ph n=5
M	5.0	12.6	7.9	9.4	7.9	7.3
+S	2.2	9.3	6.2	4.3	6.2	5.1
SEM	0.6	3.5	0.9	1.4	0.9	2.3
alpha=	0.05		n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben.

Abb.8: Zu b. "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.



n = Anzahl der Patienten

□ N = Normalpersonen

▨ A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

▩ A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

▧ AE = Patienten mit atopischem Ekzem

▨ U = Patienten mit Urtikaria

▩ Ph = Patienten mit Photodermatosen

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Tabelle 9: Zu b. Ca^{2+} -Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Ca^{2+} -Ionophore 10^{-3}

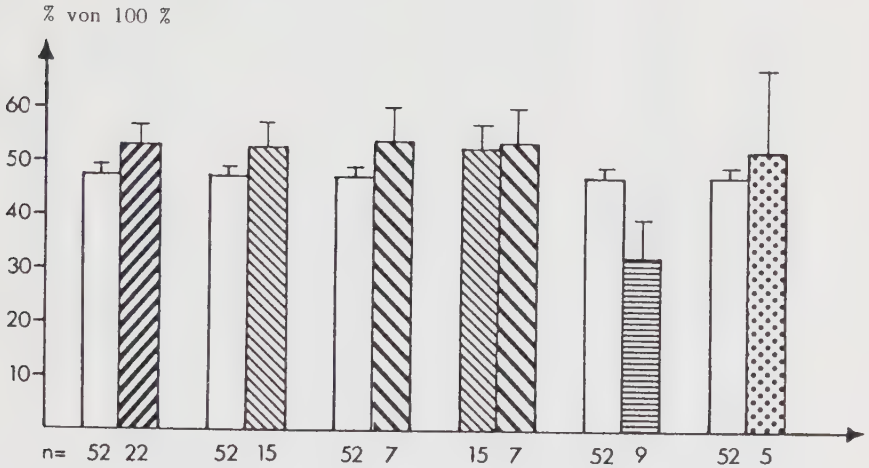
Patienten	N n=52	A n=22	N n=52	A(-E) n=15	N n=52	AE n=7
M	46.9	52.9	46.9	52.6	46.9	53.6
+S	15.2	16.9	15.2	17.7	15.2	16.2
SEM	2.1	3.6	2.1	4.6	2.1	6.1
alpha=	0.1 (n.s.)		0.1 (n.s.)		n.s.	

Patienten	A(-E) n=15	AE n=7	N n=52	U n=9	N n=52	Ph n=5
M	52.6	53.6	46.9	32.1	46.9	51.8
+S	17.7	16.2	15.2	21.9	15.2	32.8
SEM	4.6	6.1	2.1	7.3	2.1	14.7
alpha=	n.s.		0.1 (n.s.)		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.9: Zu b. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.

Ca²⁺-Ionophore 10^{-3}



N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

Tabelle 10: Zu b. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Ca²⁺-Ionophore 10⁻⁴

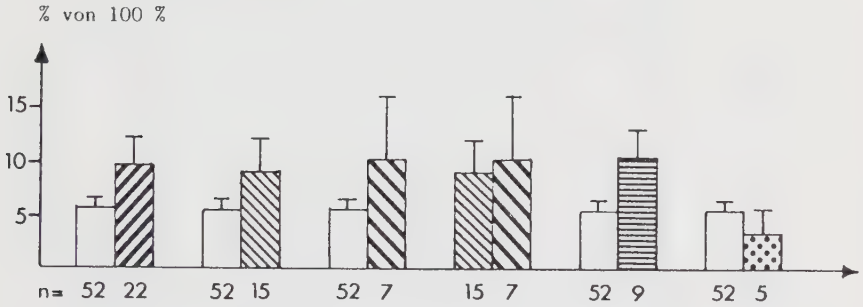
Patienten	N n=52	A n=22	N n=52	A(-E) n=15	N n=52	AE n=7
M	5.6	9.5	5.6	9.2	5.6	10.3
+S	5.2	12.5	5.2	10.9	5.2	16.5
SEM	0.7	2.7	0.7	2.8	0.7	6.2
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Patienten	A(-E) n=15	AE n=7	N n=52	U n=9	N n=52	Ph n=5
M	9.2	10.3	5.6	10.4	5.6	3.5
+S	10.9	16.5	5.2	7.9	5.2	5.2
SEM	2.8	6.2	0.7	2.7	0.7	2.3
alpha=	n.s.		0.1 (n.s.)		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.10: Zu b. Ca⁺⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.

Ca⁺⁺-Ionophore 10^{-4}



n = Anzahl der Patienten

N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

Tabelle 11: Zu b. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Ca²⁺-Ionophore 10⁻⁵

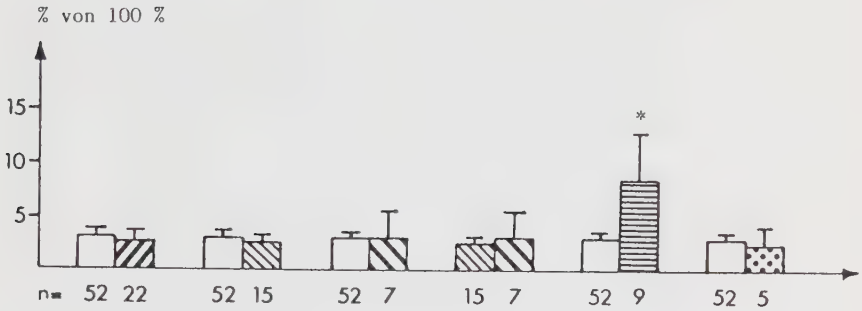
Patienten	N n=52	A n=22	N n=52	A(-E) n=15	N n=52	AE n=7
M	3.1	2.7	3.1	2.5	3.1	3.2
+S	4.4	4.2	4.4	2.5	4.4	6.8
SEM	0.6	0.9	0.6	0.6	0.6	2.6
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Patienten	A(-E) n=15	AE n=7	N n=52	U n=9	N n=52	Ph n=5
M	2.5	3.2	3.1	8.5	3.1	2.7
+S	2.5	6.8	4.4	13.1	4.4	3.8
SEM	0.6	2.6	0.6	4.4	0.6	1.7
alpha=	n.s.		0.05		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.11: Zu b. Ca -Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv .

Ca -Ionophore 10^{-5}



n = Anzahl der Patienten

N = Normalpersonen
 A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 A(-E) = Atopiker ohne Ekzem

AE = Patienten mit atopischem Ekzem
 U = Patienten mit Urtikaria
 Ph = Patienten mit Photodermatosen

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Tabelle 12: Zu c. Ca -Ionophore- induzierte Histaminfreisetzung:

Vergleich verschiedener Konzentrationen

Ca -Ionophore 10^{-3} / 10^{-4}

Patienten	N n=52		A n=22		A(-E) n=15	
Ca-Ion.	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}
M	46.9	5.5	52.9	9.5	52.6	9.2
+S	15.2	5.2	16.9	12.5	17.7	10.9
SEM	2.1	0.7	3.6	2.7	4.6	2.8
p=	0.001		0.001		0.001	

Patienten	AE n=7		U n=9		Ph n=5	
Ca-Ion.	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}
M	53.6	10.3	32.1	10.4	51.8	3.5
+S	16.2	16.5	21.9	7.9	32.8	5.2
SEM	6.1	6.2	7.3	2.7	14.7	2.3
p=	0.05		0.05.			

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Tabelle 13: Zu c. Ca²⁺-Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung:
Vergleich verschiedener Konzentrationen

Ca²⁺-Ionophore 10⁻⁴/ 10⁻⁵

Patienten	N n=52		A n=22		A(-E) n=15	
Ca-Ion.	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
M	5.6	3.1	9.5	2.7	9.2	2.5
+S	5.2	4.4	12.5	4.2	10.9	2.5
SEM	0.7	0.6	2.7	0.9	2.8	0.6
p=	0.001		0.001		0.01	

Patienten	AE n=7		U n=9		Ph n=5	
Ca-Ion.	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
M	10.3	3.1	10.4	8.5	3.5	2.7
+S	16.5	6.8	7.9	13.1	5.2	3.8
SEM	6.2	2.6	2.7	4.4	2.3	1.7
p=	0.05		n.s.			

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb. 12: Zu c. Ca -Ionophore-induzierte Histaminfreisetzung:
Vergleich verschiedener Konzentrationen

Zugehörige Wertetabellen:
Tabelle 12, 13

Ca -Ionophore 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}

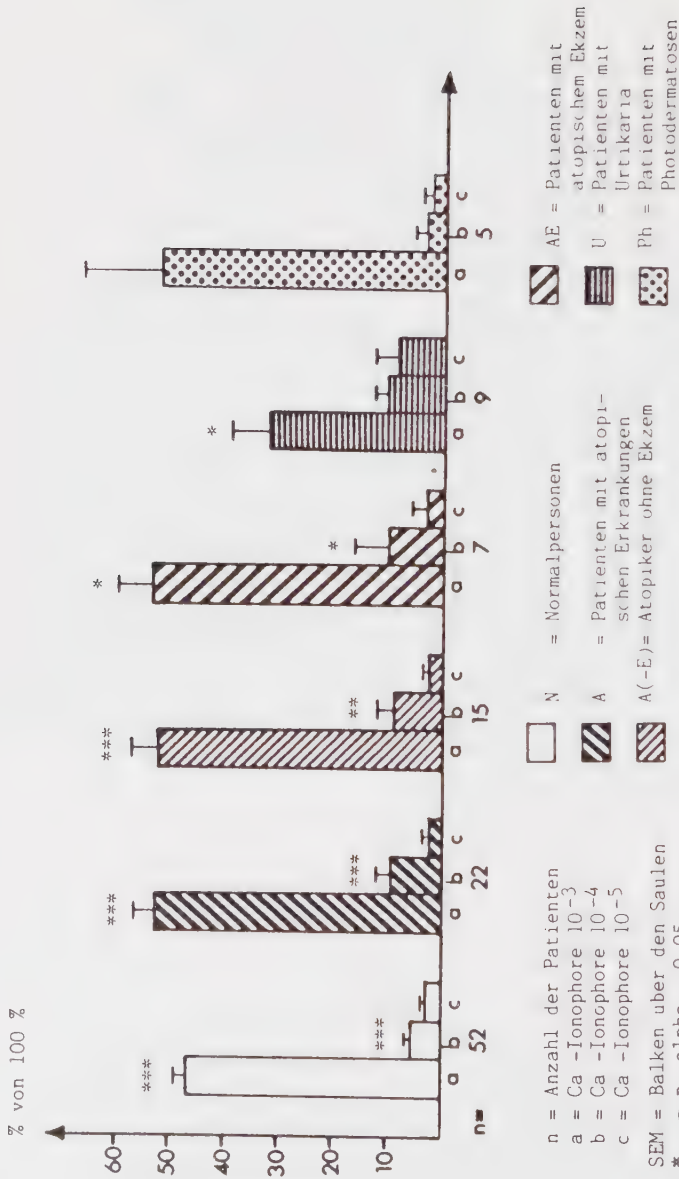


Tabelle 14: "Spontanrelease" und Ca -Ionophore-induzierte
Histaminfreisetzung bei sonstigen
allergischen Erkrankungen

Patienten	Bi/We, n=3				All.Ke, n=2				I.All, n=1			
	SR	Ca -Ionophore 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵			SR	Ca -Ionophore 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵			SR	Ca -Ionophore 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵		
M	5.2	55.2	18.3	10.5	8.9	57.4	11.7	12.6	5.5	30.8	22.7	12
+S	2.9	9.3	13.3	9.1	2.	8.4	10.2	10.2				
SEM	1.7	5.4	7.7	5.3	1.5	6	7.2	7.2				

Bi/We = Allergie gegen Bienen- und Wespengift

All.Ke = Allergisches Kontaktekzem

I.All = Insektengiftallergie (ungeklärter Genese)

Zwischen den einzelnen Patientengruppen zeigten sich keine auffälligen Unterschiede in der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Ca -Ionophore.

3. Kälte bzw. wärme-induzierte Histaminfreisetzung

3.1 Patienten und Methoden

Zur Kälte- Stimulation diente die Lagerung im Kühl- schrank bei $+4^{\circ}\text{C}$; zur Wärmestimulation wurden die Pro- ben in ein vorgewärmtes Wasserbad von 40°C und 43°C ge- stellt. Die Dauer der Stimulation betrug jeweils 30 min.

Die Bestimmung des "Spontan"-Release erfolgte durch Ste- henlassen der Proben bei Zimmertemperatur.

Die Stimulation durch Wärme- und Kälteeinfluß wurde an Leukozyten-Suspensionen von insgesamt 9 Patienten durch- geführt:

- 4 Normalpersonen = N
- 3 Patienten mit atopischen Erkrankungen = A
(Nr. 2, 6, 18)
- 2 Patienten mit Urtikaria = U
(Nr. 34, 36)

Patient Nr. 2 hatte ein atopisches Ekzem, Patientin Nr. 34 litt an Wärme-Urtikaria, Patientin Nr. 36 an chro- nischer Urtikaria. Nähere klinische Daten sind l.2 (Kli- nische Daten zu den einzelnen Erkrankungen) zu entnehmen.

Die Stimulation mit $+ 40^{\circ}\text{C}$ und $+ 43^{\circ}\text{C}$ wurde bei allen neun Patienten durchgeführt, die Kälte-Stimulation bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ nur bei 7 Patienten.

Aufteilung der Patienten nach verschiedenen Stimulationen:

Patientengruppen	+ 4°C	+ 40°C	+ 43°C
N	4	4	4
A	2	3	3
U	1	2	2
Summe n =	7	9	9

Bei der Einteilung der Patienten in Kollektive wurden wegen der geringen Probandenzahl Normalpersonen und Patienten mit atopischen Erkrankungen zu einem Kollektiv zusammengefaßt und den Patienten mit Urtikaria gegenübergestellt. So wurde eine statistische Auswertung möglich.

Dies scheint gerechtfertigt, da sich die Werte des "Spontan"-Release und der Wärme-/Kälte-Stimulation bei den Gruppen der Normalpersonen und der Patienten mit atopischen Erkrankungen nicht wesentlich voneinander unterscheiden, während sich bei den Werten der Patienten mit Urtikaria erhebliche Veränderungen ergaben.

Zur Veranschaulichung dient nachstehende Tabelle:

Tabelle 15: Vergleich "Spontan"-Release und Wärme-/Kälte-Stimulation bei Normalpersonen und Patienten mit atopischen Erkrankungen.

Normalpersonen

	n=4 SR +4°C	n=4 SR +40°C	n=4 SR +43°C
M	6.3 6.7	6.3 9.9	6.3 8.9
+S	6.1 6.7	6.1 6.5	6.1 6.2
SEM	3.0 3.4	3.0 3.3	3.0 3.1

Patienten mit atopischen Erkrankungen

	n=2 SR +4°C	n=3 SR +40°C	n=3 SR +43°C
M	9.7 3.2	9.1 5.8	9.1 6.0
+S	10.6 3.5	7.6 4.6	7.6 4.9
SEM	7.5 2.5	4.4 2.6	4.4 2.8

Die Mittelwerte verstehen sich in % der Gesamthistaminfreisetzung; da die Werte der Stimulationen mit dem des "Spontanrelease" verglichen werden, wurde letzterer nicht subtrahiert.

Es fällt auf, daß die Patienten mit atopischen Erkrankungen einen höheren "Spontan"-Release, aber eine geringere Histaminfreisetzung auf Wärme-/Kälte-Stimulation aufwiesen, als Normalpersonen. Damit ergaben sich für die Patienten mit atopischen Erkrankungen im Vergleich zum "Spontanrelease" bei Zimmertemperatur erniedrigte Stimulationswerte, umgekehrt bei den Normalpersonen erhöhte Stimulationswerte. Diese Aussagen ließen sich wegen der geringen Patientenzahlen nicht statistisch überprüfen.

3.2 Fragestellungen

Zunächst wurde der Effekt der Wärme-/Kälte-Stimulation im Vergleich zum "Spontan"-Release bei Zimmertemperatur untersucht und für die beiden Kollektive gesondert bestimmt.

Wie oben erläutert, wurden die Gruppen der Normalpersonen und die der Patienten mit atopischem Ekzem zu einem Kollektiv zusammengefaßt; die Patienten mit Urtikaria bildeten das zweite Kollektiv.

a) Vergleich:

"Spontan"-Release (Zi.-Temp.) mit + 4°C induziertem HR
 "Spontan"-Release (Zi.-Temp.) mit + 40°C induziertem HR
 "Spontan"-Release (Zi.-Temp.) mit + 43°C induziertem HR
 jeweils bei N+A und bei U

Da die Werte der Stimulationen hierbei mit den Werten des "Spontan"-Release in Beziehung gesetzt werden, wurde letzterer nicht subtrahiert. Da die Gruppe der Patienten mit Urtikaria nur aus 2 Patienten bestand, konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Zur Veranschaulichung der z.T. bemerkenswerten Veränderungen wurden jedoch Tabellen und graphische Darstellungen angegeben.

Des weiteren interessierte die Frage, ob sich zwischen beiden oben genannten Kollektiven ein Unterschied der Histaminfreisetzung bei Zimmertemperatur, bzw. bei Wärme-/Kälte-Stimulation ergab:

b) Vergleich:

"Spontan"-Release (Zi.-Temp.)
 + 4°C - induzierter HR N+A mit U
 + 40°C - induzierter HR
 + 43°C - induzierter HR

Auch in diesem Fall wurden die Werte des "Spontan"-Release nicht von den Stimulationswerten abgezogen. Diese Untersuchung kann als Vergleich des Histamin-Release bei verschiedenen Temperaturen gedeutet werden, wozu

auch der "Spontan"-Release bei Zimmertemperatur zählt. Hiermit kommt ihm keine eigentliche "Leerwert"-Funktion zu.

Diese Überlegung erfolgte insofern, als sich bei Kälte-/Wärme-Stimulation besonders bei den Patienten mit atopischen Erkrankungen niedrigere Werte fanden als bei Zimmertemperatur. Bei Subtraktion des "Spontan"-Release würden also häufig negative Werte resultieren, was so vermieden wurde.

Zusätzlich wurde untersucht, ob sich bei den beiden Kollektiven die Werte der Wärme-/Kälte-Stimulation signifikant voneinander unterscheiden:

c) Vergleich:

+ 4 ⁰ C- mit + 40 ⁰ C- induziertem HR	jeweils bei
+ 4 ⁰ C- mit + 43 ⁰ C- induziertem HR	N+A und
+ 40 ⁰ C- mit + 43 ⁰ C- induziertem HR	bei U

Nach Maßgabe der obengenannten Gründe wurde auch hier der "Spontan"-Release nicht subtrahiert.

HR = Histamin-Release

3.3 Ergebnisse

Zu a. Kälte-/Wärme-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei Zimmertemperatur

Beim Kollektiv der Normalpersonen und Atopiker fand sich bei Kälte-Stimulation eine gegenüber dem "Spontan"-Release (Zimmertemperatur) von durchschnittlich 7.4 % leicht erniedrigte Histaminfreisetzung mit 5.6 %. Bei Wärme-Stimulation war die Freisetzung leicht erhöht ($+4^{\circ}\text{C}$ 8.1 %, $+43^{\circ}\text{C}$ 7.7 %). Diese Veränderungen waren nicht signifikant.

Von den Patienten mit Urtikaria wurde nur bei einer Patientin mit chronischer Urtikaria (Nr.36) eine Kälte-Stimulation durchgeführt, wobei daraufhin eine Histaminfreisetzung von 90 % (der Gesamthistaminfreisetzung) resultierte. Diese Patientin hatte mit 2.49 % einen sehr niedrigen "Spontan"-Release.

Die Wärme-Stimulation bei $+40^{\circ}\text{C}$ und $+43^{\circ}\text{C}$ wurde bei beiden Urtikaria-Patientinnen durchgeführt, wobei die durchschnittlichen Werte der Histaminfreisetzung mit 30.4 % und 39.7 % ebenfalls deutlich über dem "Spontan"-Release von 7.8 % lagen.

Eine statistische Auswertung war wegen der geringen Patientenzahl nicht möglich.

Zu b. "Spontan"-Release und Kälte-/Wärme-induzierte Histaminfreisetzung bei Normalpersonen und Atopikern
im Vergleich zu Patienten mit Urtikaria

Bei Zimmertemperatur ("Spontan"-Release) war die durchschnittliche Histaminfreisetzung bei beiden Patientengruppen nahezu identisch (7.5 % und 7.8 %); anders jedoch bei Kälte- und Wärme-Stimulation:

Der enorm hohen Freisetzung von Patientin Nr.36 auf Kälte-Stimulation stand der Durchschnittswert der Normalpersonen und Atopiker von 5.6 % gegenüber.

Nach Wärme-Stimulation bei + 40° C lagen die Werte der Patientinnen mit Urtikaria ebenfalls deutlich höher als die der Normalpersonen und Atopiker (Der Durchschnittswert für U = 30.4 %; davon setzte Patientin Nr. 34 15.8 % Histamin frei und Patientin Nr. 36 45.0%. Der Durchschnittswert für N+A = 8.1 %.). Dasselbe galt für die Stimulation bei +43° C: U = 39.7 %, Patientin Nr. 34 = 34.4 %, Patientin Nr. 36 = 45.0 %, N+A = 7.7 %.

Bei Patientin Nr.34 ist nach Wärme-Stimulation eine Dosisabhängigkeit der Freisetzung, nämlich bei +43° C mehr als bei +40° C, festzustellen. Bei dieser Patientin handelt es sich im Übrigen um eine Wärme-Urtikaria; eine entsprechende Kasuistik wurde von K.Schrallhammer et al. bereits veröffentlicht.

Wegen der geringen Patientenzahlen sind diese Veränderungen jedoch nicht signifikant; lediglich für die Stimulation bei +43° C ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.1$ (nicht mehr signifikant).

Zu c) Kälte-/Wärme-induzierte Histaminfreisetzung:

Vergleich verschiedener Temperaturen.

Bei der Gruppe der Normalpersonen und Atopiker fand sich im Vergleich zu den Werten bei Kälte-Stimulation (durchschnittlich 5.6 %) eine leicht erhöhte Histaminfreisetzung bei 40°C (8.28 %) und 43°C (7.83 %), wobei die Werte für 43°C niedriger lagen als bei 40°C. Für den Vergleich der Freisetzung bei + 4°C und + 43°C ergab sich ein Signifikanz-Niveau von $p = 0.05$.

Die Kälte-Stimulation bei den Patientinnen mit Urtikaria betrifft nur Patientin Nr. 36, wobei dieses Ergebnis mit 90 % wesentlich höher war als die Werte, die diese Patientin für 40°C und 43°C aufwies, nämlich jeweils 45 %.

Anders als bei dem Kollektiv der Normalpersonen und Atopiker, ließ sich bei den Patientinnen mit Urtikaria eine Steigerung der Histaminfreisetzung von 40°C auf 43°C feststellen; d.h. von durchschnittlich 30.4 % auf 39.7 %. Da Patientin N. 36 für diese Temperaturen identische Freisetzungswerte zeigte (s.o.), ging diese Veränderung auf Patientin Nr. 34 mit Wärme-Urtikaria zurück: Sie setzte bei 40°C 15.8 % des Gesamt-Histamins frei und bei 43°C 34.4 %.

Auch hier konnte wegen der geringen Zahl der Patienten mit Urtikaria keine statistische Auswertung vorgenommen werden.

Tabelle 16a: Zu a. Kälte-/Wärme- induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei Zimmertemperatur

Normalpersonen und Atopiker

Stimulation	n=6		n=7		n=7	
	SR	+4°C	SR	+40°C	SR	+43°C
M	7.4	5.6	7.5	8.2	7.5	7.7
+S	6.9	5.7	6.3	5.8	6.3	5.4
SEM	2.8	2.3	2.4	2.2	2.4	2.1
p=	n.s.		n.s.		n.s.	

Patienten mit Urtikaria

Stimulation	n=1		n=2		n=2	
	SR	+4°C	SR	+40°C	SR	+43°C
M	2.5	90.0	7.8	30.4	7.8	39.7
+S			7.5	20.6	7.5	7.5
SEM			5.3	14.6	5.3	5.3

Da die beiden Patientinnen untereinander sehr unterschiedliche Werte aufwiesen, wurden ihre Freisetzungsraten gesondert angegeben:

Tabelle 16b: Zu a. Kälte-/Wärme- induzierte Histaminfreisetzung bei zwei Patientinnen mit Urtikaria

Patientin Nr.	34	36
SR	13.1	2.5
46°C	15.8	45.0
43°C	34.4	45.0
4°C		90.0

Bei Patientin Nr. 34 handelte es sich um eine lokalisierte Wärme-Urtikaria; bei Patientin Nr. 36 um chronische Urtikaria.

Bem: Alle Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

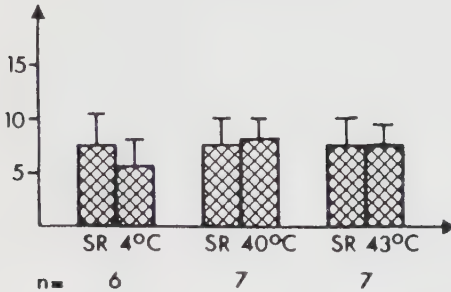
Abb.13: Zu a. Kälte-/Wärme-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei Zimmertemperatur

Normalpersonen und Atopiker

% von 100 %

Zugehörige Wertetabelle:

Tabelle 16 a



n = Anzahl der Patienten
SR = "Spontan"-Release



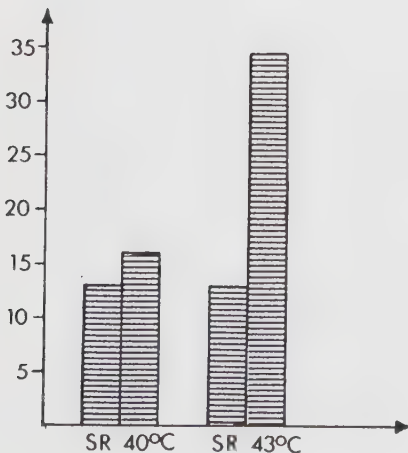
N + A = Normalpersonen
und Atopiker

Abb.14: Zu a. Wärme-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release am Beispiel einer Patientin mit lokalisierter Wärme-Urtikaria

% von 100 %

Zugehörige Wertetabelle:

Tabelle 16 b



SR = "Spontan"-Release



U = Patienten mit
Urtikaria

4. Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung

4.1 Patienten und Methoden

Hierzu wurden die Proben mittels einer Pasteur-Plastikpipette zusätzlich zum normalen Vorgang je 10 mal und je 30 mal kräftig suspendiert.

Im Vergleich dazu wurden bei der Herstellung der Proben die Zellsuspensionen nach jedem der drei Aufschwemmungsvorgänge im Durchschnitt 5 mal mit dieser Pipette suspendiert (also insgesamt ca 15 mal), allerdings möglichst vorsichtig.

Als weiteres Instrument zur mechanischen Stimulation diente der Vortex-Genie-Schüttler, jeweils 1 min bei Stärke 10.

Die mechanische Stimulation wurde an Leukozyten-Suspensionen von insgesamt 33 Patienten durchgeführt:

- 17 Normalpersonen = N
- 11 Patienten mit atopischen Erkrankungen = A
 (Nr. 1, 2, 3, 5, 6, 12, 18, 19, 20, 21, 24)
 3 davon mit atopischem Ekzem (Nr. 2, 21, 24),
 welche jedoch nicht gesondert aufgeführt wurden.
- 3 Patienten mit Urtikaria = U
 (Nr. 30, 34, 36)
- 1 Patient mit allergischem Kontaktekzem = All.KE
 (Nr. 46)
- 1 Patient mit Insektengift-Allergie = I.All.
 (Nr. 47)

Bemerkungen zu den Patienten:

Die drei zuletzt aufgelisteten Patientengruppen konnten wegen zu geringer Fallzahlen nicht statistisch ausgewertet werden und wurden auch nicht in die graphische Dar-

stellung aufgenommen. Tabellen mit Mittelwerten und Standardabweichungen wurden jedoch erstellt.

Nicht bei allen Patienten wurden beide Möglichkeiten der mechanischen Stimulation eingesetzt:

- . Aufteilung der Patienten nach verschiedenen mechanischen Stimulationen:

Patienten- gruppen	Pasteurpip. 30 x "	Pasteurpip. 10 x	Vortex-Schüttler 1 min.
N	17	10	16
A	11	7	11
U	3	1	3
All.KE	1	1	1
I.All.	1	1	1
Summe n =	33	20	32

4.2 Fragestellungen

Auch hier wurde zunächst untersucht, ob die Histaminfreisetzung nach mechanischer Stimulation sich gegenüber den Werten des "Spontan"-Release verändert:

a) Vergleich:

"Spontan"-Release mit Pasteur-Pip. 30 x - induz. HR

"Spontan"-Release mit Pasteur-Pip. 10 x - induz. HR

"Spontan"-Release mit Vortex-Sch. 1 min - induz. HR

jeweils bei N und A

Der "Spontan"-Release wurde hierbei nicht von den Stimulationswerten subtrahiert, da letztere zu ihm in Beziehung gesetzt wurden.

Als nächstes wurde untersucht, ob zwischen den beiden Kollektiven der Normalpersonen und der Patienten mit atopischen Erkrankungen hinsichtlich der mechanischen Stimulation Unterschiede bestehen. Die Höhe des "Spontan"-Release wurde ebenfalls bei beiden Kollektiven miteinander verglichen:

b) Vergleich:

"Spontan"-Release

Pasteur-Pip. 30 x - induz. HR

Pasteur-Pip. 10 x - induz. HR N mit A

Vortex-Sch. 1 min - induz. HR

Von den Stimulationswerten wurden die Werte des "Spontan"-Release subtrahiert.

Ob sich die verschiedenen Möglichkeiten der mechanischen Stimulation in ihrer Wirkung unterscheiden, behandelt die letzte Fragestellung.

Dies wurde für jedes der beiden Kollektive gesondert bestimmt:

c) Vergleich:

Pasteur-Pip. 10 x mit 30 x - induz. HR

Pasteur-Pip. 10 x mit Vortex-Sch. 1 min - induz. HR

Pasteur-Pip. 30 x mit Vortex-Sch. 1 min - induz. HR

jeweils bei N und A.

Auch hierbei wurden die Werte des "Spontan"-Release subtrahiert. Wenn (in seltenen Fällen) bei der Subtraktion negative Werte resultierten, wurden sie gleich Null gesetzt.

HR = Histamin-Release

4.3 Ergebnisse

Zu a) Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

Bei beiden Kollektiven (Normalpersonen und Patienten mit atopischen Erkrankungen) fanden sich bei sämtlichen mechanischen Stimulationsweisen gegenüber dem "Spontan"-Release signifikant erhöhte Werte für die Histaminfreisetzung. Für die Stimulationen mit der Pasteurpipette 30 x und mit dem Vortex-Schüttler ergaben sich Signifikanzniveaus von $p = 0.001$ bei Normalpersonen und Atopikern; für die Stimulation mit der Pasteurpipette 10 x wohl wegen der geringeren Fallzahl Signifikanzniveaus von $p = 0.01$ bzw. 0.05 .

Zu b) "Spontan"-Release und mechanisch induzierte Histaminfreisetzung bei Patienten mit atopischen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.

Was die Höhe des "Spontan"-Release betrifft, so fand sich zwischen beiden obengenannten Kollektiven mit durchschnittlich 7.0 % (N) und 6.9 % (A) der Gesamthistaminfreisetzung kein signifikanter Unterschied.

Das gleiche gilt für die mechanische Stimulation: Bei Stimulation mittels Pasteurpipette betrug die Histaminfreisetzung durchschnittlich 41 % (N) bzw. 39.4 % (A) bei 30 maliger Anwendung; bei 10 maliger Anwendung erreichte sie 25.4 % (N) bzw. 21.6 % (A).

Die Stimulation mit dem Vortex-Schüttler ergab Freisetzungswerte von 19 % (N) und 13.8 % (A).

Tabelle 17: Zu a. Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

Normalpersonen

	n=17		n=10		n=16	
	SR	P30	SR	P10	SR	V ₀
M	7.0	47.9	7.0	30.8	7.2	26.3
+S	4.6	11.5	4.4	11.1	4.6	19.3
SEM	1.1	2.8	1.4	3.5	1.2	4.8
p=	0.001		0.01		0.001	

Patienten mit atopischen Erkrankungen

	n=11		n=7		n=11	
	SR	P30	SR	P10	SR	V ₀
M	6.9	46.3	6.4	31.4	6.9	20.7
+S	5.6	16.1	5.4	13.7	5.6	17.7
SEM	1.7	4.9	2.0	5.2	1.7	5.3
p=	0.001		0.05		0.001	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; bei den Stimulationswerten ohne Subtraktion des "Spontanrelease".

Abb 15: Zu a. Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung
im Vergleich zum "Spontan"-Release

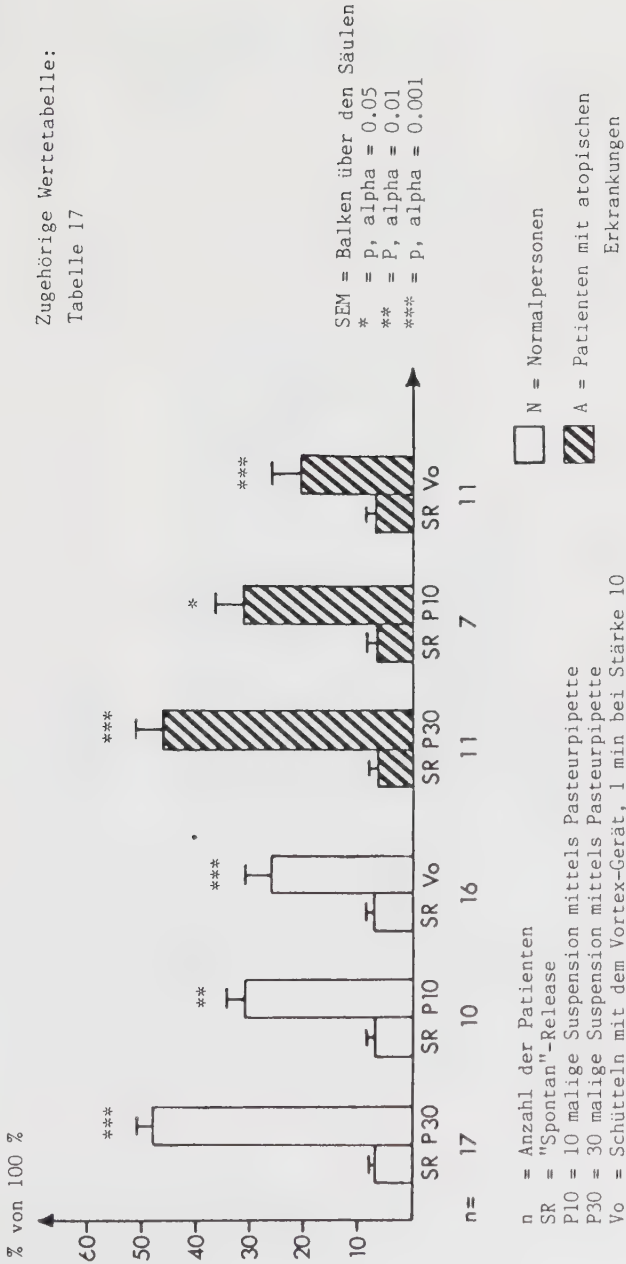
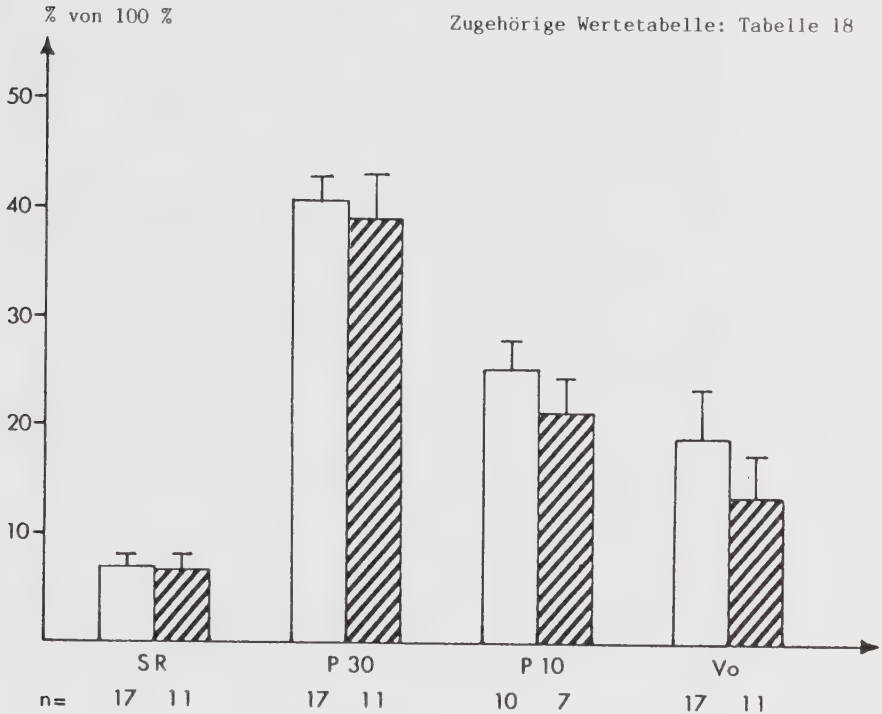


Tabelle 18: Zu b. "Spontan"-Release und mechanisch induzierte Histamin freisetzung bei Patienten mit atopischen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Stimulation	SR		P30		P10		Vo	
Patienten	N n=17	A n=11	N n=17	A n=11	N n=10	A n=7	N n=17	A n=11
M	6.7	6.9	50.0	39.4	25.4	21.6	19.0	13.8
+S	4.6	5.6	9.0	12.6	8.5	8.6	18.5	14.2
SEM	1.1	1.7	2.2	3.8	2.7	3.2	4.6	4.3
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.16: Zu b. "Spontan"-Release und mechanisch induzierte Histaminfreisetzung bei Patienten mit atopischen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv



n = Anzahl der Patienten

SR = "Spontan"-Release

P10 = 10 malige Suspension mittels Pasteurpipette

P30 = 30 malige Suspension mittels Pasteurpipette

Vo = Schütteln mit dem Vortex-Gerät, 1 min bei Stärke 10

N = Normalpersonen

A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

Zu c) Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung:

Vergleich verschiedener Methoden

Zunächst wurde die 10-malige Anwendung der Pasteurpipetten der Wirkung bei 30-maliger Anwendung gegenübergestellt. Hierbei fand sich sowohl bei Normalpersonen, als auch bei den Atopikern eine signifikant höhere Histaminfreisetzung bei der häufigeren Anwendung ($p = 0.01$ für N und $p = 0.05$ für A).

Vergleicht man die 10 malige Anwendung der Pasteurpipette mit der Stimulation durch den Vortex-Schüttler, so ergab sich bei den Normalpersonen kein signifikanter Unterschied in der Freisetzung, wohingegen bei den Patienten mit atopischen Erkrankungen ein signifikant höherer Wert nach Stimulation mit der Pasteurpipette erreicht wurde ($p = 0.05$).

Am deutlichsten war der Unterschied zwischen 30-maliger Anwendung der Pasteurpipette und der Stimulation mit dem Vortex-Schüttler: Er war signifikant bei Normalpersonen und Atopikern mit $p = 0.01$ für N und $p = 0.001$ für A.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß 30-malige Anwendung der Pasteurpipette die höchste Histaminfreisetzung bewirkte und die Stimulation mit dem Vortex-Schüttler die niedrigste, bei beiden Kollektiven. 30 malige Anwendung der Pasteurpipette setzte signifikant mehr Histamin frei als die 10 malige Anwendung, ebenfalls bei beiden Kollektiven.

Hiermit konnte eine Dosisabhängigkeit der mechanischen Stimulierung nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Zu c. Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung:
Vergleich verschiedener Methoden

Normalpersonen

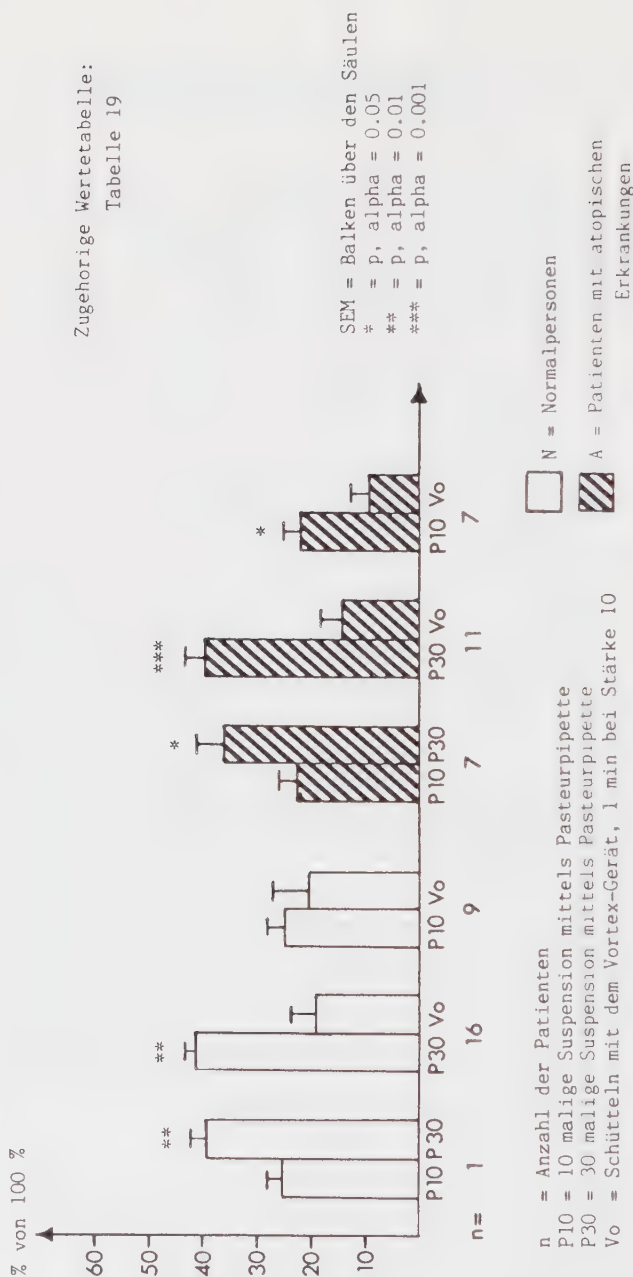
Stimulation	n=10		n=9		n=16	
	P10	P30	P10	Vo	P30	Vo
M	25.4	39.2	25.2	20.3	41.4	19.0
+S	8.5	8.6	9.0	18.6	9.1	18.5
SEM	2.7	2.7	3.0	6.2	2.3	4.6
p=	0.01		n.s.		0.01	

Patienten mit atopischen Erkrankungen

Stimulation	n=7		n=7		n=11	
	P10	P30	P10	Vo	P30	Vo
M	21.6	36.0	21.6	9.2	39.4	13.8
+S	8.6	12.9	8.6	9.0	12.6	14.2
SEM	3.2	4.9	3.2	3.4	3.8	4.3
p=	0.05		0.05		0.001	

Bem: die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release

Abb.17: Zu c. Mechanisch induzierte Histaminfreisetzung:
Vergleich verschiedener Methoden



Abschließend seien noch die Werte der Histaminfreisetzung für die übrigen Patienten angegeben, bei denen infolge zu geringer Fallzahl keine statistische Auswertung möglich war:

Tabelle 20 a: "Spontan"-Release und mechanisch induzierte Histaminfreisetzung bei Patienten mit Urtikaria

	n = 3 SR Pasteur 30x		n = 3 SR Vortex 1min		n = 1 SR Pasteur 10x	
M	8.1	43.9	8.1	19.4	8.7	47.3
+S	5.3	38.6	5.3	4.5		
SEM	3.1	22.3	3.1	2.6		

An diesen Untersuchungen nahmen auch die beiden Patientinnen teil (Nr.34 und Nr.36), die bei Kälte-/Wärme-Stimulation auffällige Freisetzungsraten gezeigt hatten; daher wurden im Folgenden die Werte der Patienten mit Urtikaria nochmals einzeln aufgeführt:

Tabelle 20 b:

Patientin Nr	30	34	36
SR	8.7	13.1	2.5
P30	78.9	50.3	2.5
Vo	19.2	24.0	12.5
P10	47.3.		

Tabelle 20 c: "Spontan"-Release und mechanisch ausgelöste Histaminfreisetzung bei Patienten mit sonstigen allergischen Erkrankungen

	SR	Pasteur 30x	Vortex 1 min	Pasteur 10x
1 Patient I.All.	5.5	52.4	21.0	37.6
1 Patient All.KE	7.7	43.1	30.1	29.4

Bem: Alle Mittel-und Einzelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten.

Im wesentlichen gelten alle Aussagen, die zuvor schon für Normalpersonen und Patienten mit atopischen Erkrankungen getroffen worden waren.

Eine Patientin mit Urtikaria (Nr.30), bei welcher eine Stimulation mit 10-maliger Anwendung der Pasteurpipette durchgeführt worden war (47.3%), zeigte bei 30-maliger Anwendung 78.9 % der Gesamt-Histaminfreisetzung, sodaß auch hier die Dosisabhängigkeit gewahrt blieb.

Ansonsten zeigten die Zellen der Patientinnen mit Urtikaria relativ hohe Freisetzungsraten bei 30-maliger Suspension mittels Pasteurpipette, bis auf Patientin Nr.36, bei der sich nur eine sehr geringe mechanische Stimulierbarkeit zeigte.

5. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung

5.1 Patienten und Methoden

Hierbei wurden die Proben zunächst zentrifugiert und der Überstand der Zellsuspension verworfen. Die verbleibenden Zellen wurden mit der gleichen Menge der osmotisch wirksamen Reagenzien wieder aufgefüllt, sodaß die übliche Füllmenge der Analysenröhrchen (0-6 ml) wiederhergestellt war.

Dieses Verfahren erbrachte eine genügend hohe Histaminfreisetzung, während Zugabe von nur jeweils 100 μ l osmotisch wirksamer Substanz zu den Proben keine nennenswerte Wirkung zeigte. Dies hatten entsprechende Vorversuche mit Mannit 10 % ergeben.

Als osmotisch wirksame Substanzen dienten:

- hyperosmolar: NaCl 4.1 % (1324 mosm/ml)
- Mannit 1 % (355 mosm/l) jeweils
- 5 % (575 mosm/l) inclusive
- 7.5 % (712 mosm/l) 300 mosm/l
- 10 % (850 mosm/l) für den isotonen
- isomolar: NaCl 0.9 % (300 mosm/ml) TCM-Puffer
- hyposmolar: Aqua.dest

Die osmotische Stimulation wurde an Leukozyten-Suspensionen von insgesamt 22 Patienten durchgeführt:

- 10 Normalpersonen = N
- 9 Patienten mit atopischen Erkrankungen = A
 (Nr. 1, 2, 3, 5, 6, 18, 19, 20, 21)
 2 dieser Patienten hatten ein atopisches Ekzem
 (Nr. 2 und Nr. 21); dies wurde jedoch nicht
 gesondert aufgeführt.
- 2 Patienten mit Urtikaria = U
 (Nr. 30 und 34)
- 1 Patient mit allergischem Kontaktekzem = All.KE
 (Nr. 46)

Aufteilung der Patienten nach verschiedenen osmotischen Stimulationen:

	NaCl 0.9% + 4.1%	Aqua dest. Kinetik	Mannit Kinetik
N	10	3	3
A	9	3	4
U	2	2	
All.KE	1		1
Summe n =	22	8	8

Bemerkung: Bei den kinetischen Untersuchungen für die Stimulation mit Aqua dest. und Mannit wurden die Werte der Histaminfreisetzung aller 8 Probanden einzeln graphisch dargestellt, also auch die der Patienten mit Urtikaria und allergischem Kontaktekzem. Trotz der geringen Fallzahlen der letztgenannten Patientengruppen wurden sie daher auch in die graphische Darstellung der Stimulation mit NaCl aufgenommen.

Die Kinetik bei Stimulation mit Aqua dest. bezieht sich auf die Einwirkungsdauer: 1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 min. Die Kinetik bei Stimulation mit Mannit bezieht sich auf die Konzentration in TCM-Puffer: 1, 5, 7.5 und 10 %.

5.2 Fragestellungen:

Diese beziehen sich nur auf die Stimulation mit NaCl 0.9 % und 4.1 %; die kinetischen Untersuchungen mit Aqua dest. und Mannit wurden gesondert dargestellt.

Zunächst wurde wieder die Veränderung der Histaminfreisetzung nach osmotischer Stimulation gegenüber dem "Spontan"-Release untersucht:

a) Vergleich:

"Spontan"-Release mit NaCl 0.9 % -induz.HR	bei N, A,
"Spontan"-Release mit NaCl 4.1 % -induz.HR	U, All.KE

Es erfolgte keine Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten, da ersterer Teil des Vergleiches ist.

Bemerkung: Die Patienten mit Urtikaria und der Patient mit allergischem Kontaktekzem wurden zwar in die graphische Darstellung aufgenommen, eine statistische Auswertung konnte wegen zu geringer Fallzahlen bei obiger Fragestellung (WILCOXON-Test) nicht durchgeführt werden.

Desweiteren wurde untersucht, ob sich "Spontan"-Release und Histaminfreisetzung nach osmotischer Stimulation bei verschiedenen Kollektiven von den Werten des Normalkollektivs unterscheiden:

b) Vergleich:

"Spontan"-Release	N mit A
NaCl 0.9 % - induz. HR	N mit U
NaCl 4.1 % - induz. HR	N mit All.KE

Von den Stimulationswerten wurde der "Spontan"-Release nicht subtrahiert, da der in diesem Milieu vorhandene TCM - Puffer vor der osmotischen Stimulation abzentrifugiert wurde, ehe die verbleibenden Zellen mit NaCl versetzt wurden. Es existieren also verschiedene Medien,

nämlich TCM - Puffer ("Spontan"-Release) und NaCl 0.9% bzw. 4.1%, von denen jedes als osmotisch wirksame Substanz aufgefaßt werden kann und gesondert betrachtet wird.

HR = Histamin-Release

Bemerkung:

Bei Fragestellung b) ist auch für die Patienten mit Urtikaria und allergischem Kontaktekzem eine statistische Auswertung möglich mit dem U - Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY.

5.3 Ergebnisse der Stimulation mit NaCl 0.9 % und 4.1 %

Zu a) Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release:

Im Medium NaCl 0.9 % setzten die Zellen der Normalpersonen mit 2.7 % des Gesamtrelease signifikant weniger Histamin frei als im Medium TCM-Puffer (= "Spontan"-Release) mit 6.1 %. Das Signifikanzniveau lag bei $p = 0.01$.

Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei den beiden Patienten mit Urtikaria (NaCl 0.9 % = 2.3 %, "Spontan"-Release = 10.9 %), angedeutet auch bei den Patienten mit allergischem Kontaktekzem (NaCl 0.9 % = 6.7 %, "Spontan"-Release = 7.7 %).

Wegen der geringen Fallzahl letzterer Probanden konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

Anders verhielten sich die Patienten mit atopischen Erkrankungen: Die Histaminfreisetzung im Medium NaCl 0.9 % war geringfügig höher (6.3 %) als der "Spontan"-Release (6.0%), jedoch nicht signifikant.

Im Medium NaCl 4.1 % war sowohl bei den Normalpersonen, als auch bei den Patienten mit atopischen Erkrankungen eine gegenüber dem "Spontan"-Release ($N = 6.1 \%$, $A = 6 \%$) signifikant erhöhte Histaminfreisetzung nachweisbar ($N = 14\%$, $A = 20.6\%$). Das Signifikanzniveau betrug $p = 0.05$ bzw. $p = 0.01$.

Dasselbe ließ sich auch bei den Patienten mit Urtikaria ($U = 17.4 \%$) und bei den Patienten mit allergischem Kontaktekzem ($All.KE = 11.9\%$) nach Stimulation mit NaCl 4.1% beobachten.

Zu b) "Spontan"-Release und osmotisch induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Hinsichtlich des "Spontanrelease" (d.h. im Medium TCM-Puffer) fand sich bei allen Kollektiven (A , U , $All.KE$) kein signifikanter Unterschied zum Normalkollektiv mit 6.1% der Gesamthistaminfreisetzung.

Lediglich die beiden Patienten mit Urtikaria fielen auf durch einen relativ hohen "Spontan"-Release von 10.9% , dies war jedoch nicht signifikant ($\alpha = 0.1$).

Zu b) Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

-Betrachtet man die Ergebnisse der Stimulation mit NaCl 0.9% , so fand sich bei den Atopikern mit 6.3% der Gesamthistaminfreisetzung ein sinifikant höherer Wert als bei den Normalpersonen mit 2.7% ($p = 0.05$).

Der Patient mit allergischem Kontaktekzem zeigte eine den Atopikern vergleichbare Freisetzung von 6.7% .

Die beiden Patienten mit Urtikaria setzten mit 2.3% fast genauso viel Histamin frei wie die Normalpersonen.

-Nach Stimulation mit NaCl 4.1 % ergab sich bei allen genannten Kollektiven kein signifikanter Unterschied der Histaminfreisetzung gegenüber den Normalpersonen. Letztere erreichten einen Durchschnittswert von 14.3%, die Atopiker 20.6 %, die Patienten mit Urtikaria 17.4% und der Patient mit allergischem Kontaktekzem 11.9%. Es zeigte sich, daß die Patienten mit atopischen Erkrankungen auch hier die höchste Freisetzung boten.

Tabelle 21: Zu a. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

NaCl 0.9%

Patienten	N n=10		A n=9		U n=2		All.KE n=1	
	SR	NaCl	SR	NaCl	SR	NaCl	SR	NaCl
M	6.1	2.7	6.0	6.3	10.9	2.3	7.7	6.7
+S	3.3	1.0	4.7	6.9	3.1	1.7		
SEM	1.1	0.3	1.6	2.3	2.2	1.2		
p=	0.01		n.s.					

Bem. Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release

Abb.18: Zu a. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

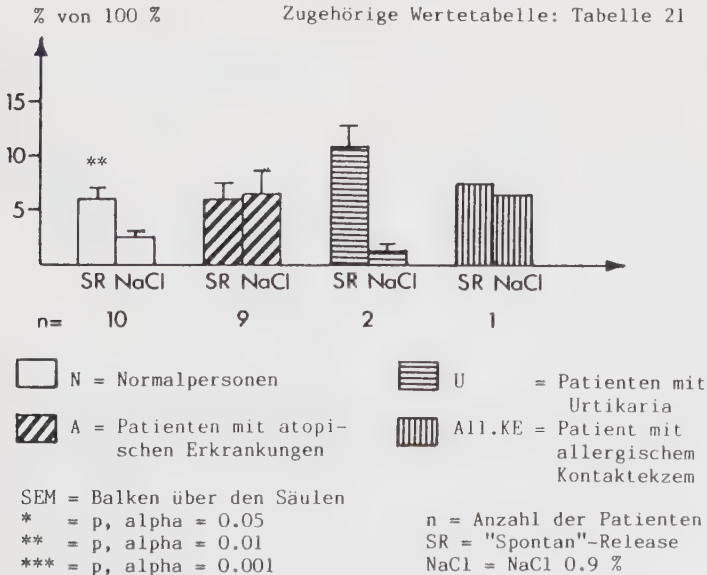


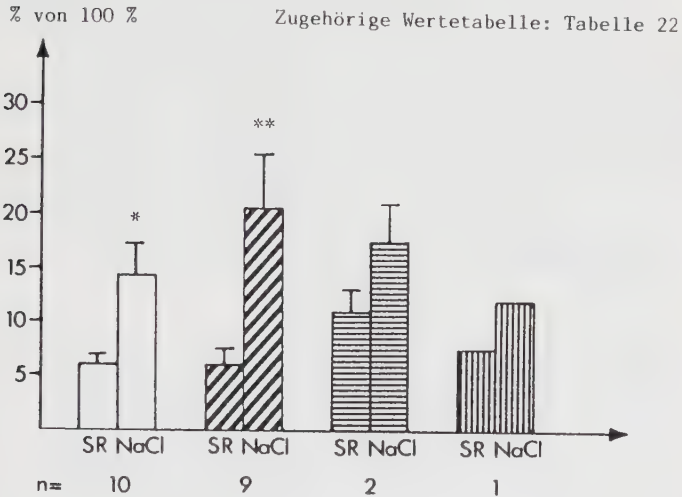
Tabelle 22: Zu a. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

NaCl 4.1%

Patienten		N n=10		A n=9		U n=2		All.KE n=1	
		SR	NaCl	SR	NaCl	SR	NaCl	SR	NaCl
M		6.1	14.3	6.0	20.6	10.9	17.4	7.7	11.9
+S		3.3	9.2	4.7	14.8	3.1	5.2		
SEM		1.1	2.9	1.6	4.9	2.2	3.7		
p=		0.05		0.01					

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.19: Zu a. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen



n = Anzahl der Patienten
 SR = "Spontan"-Release
 NaCl = NaCl 4.1 %

□ N = Normalpersonen

▨ A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

▤ U = Patienten mit Urtikaria

▥ All.KE = Patient mit allergischem Kontaktekzem

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Tabelle 23 Zu b. "Spontan"-Release" bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normal-kollektiv

Patienten	N n=10	A n=9	N n=10	U n=2	N n=10	All.KE n=1
M	6.1	6.0	6.1	10.9	6.1	7.7
+S	3.3	4.7	3.3	3.1	3.3	
SEM	1.1	1.6	1.1	2.2	1.1	
alpha=	n.s.		n.s.(0.1)		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben.

Abb.20: Zu b. "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv



n = Anzahl der Patienten

□ N = Normalpersonen
 ▨ A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

▤ U = Patienten mit Urtikaria
 ▦ All.KE = Patient mit allergischem Kontaktekzem

Tabelle 24: Zu b. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

NaCl 0.9 %

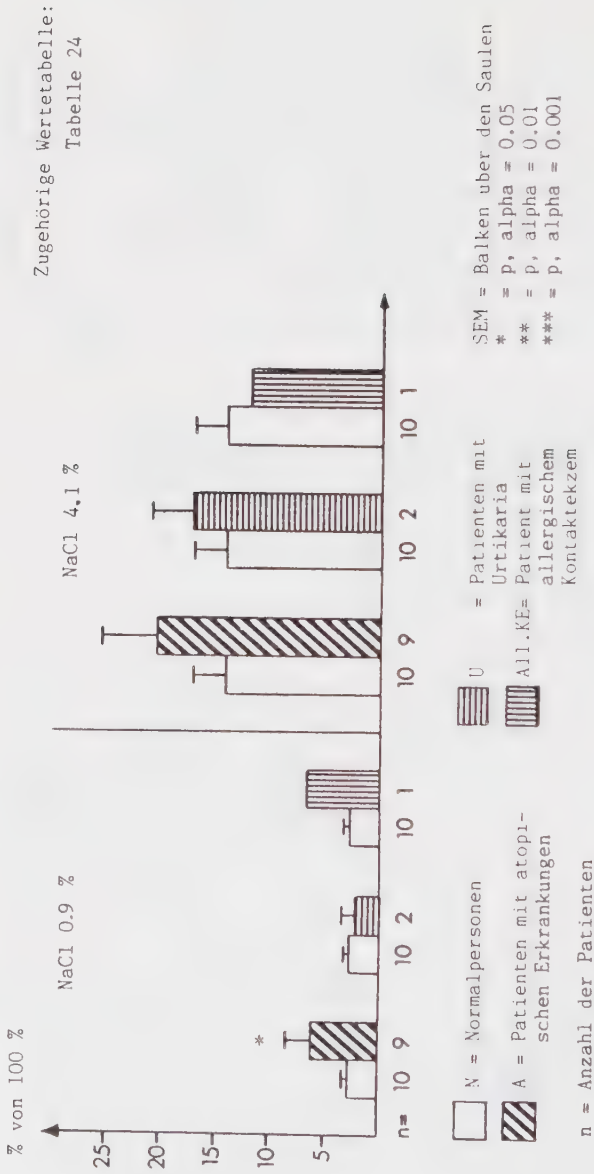
Patienten	N n=10	A n=9	N n=10	U n=2	N n=10	All.KE n=1
M	2.7	6.3	2.7	2.3	2.7	6.7
+S	1.0	6.9	1.0	1.7	1.0	
SEM	0.3	2.3	0.3	1.2	0.3	
alpha=	0.05		n.s.		n.s.	

NaCl 4.1 %

Patienten	N n=10	A n=9	N n=10	U n=2	N n=10	All.KE n=1
M	14.3	20.6	14.3	17.4	14.3	11.9
+S	9.2	14.8	9.2	5.2	9.2	
SEM	2.9	4.9	2.9	3.7	2.9	
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Bem: die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb. 21: Zu b. Osmotisch induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv



5.4 Ergebnisse der Stimulation mit Aqua dest.

Die Zellen der Probanden wurden für unterschiedliche Zeiträume (1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 min.) dem Medium Aqua dest. ausgesetzt. Die Einwirkung wurde gestoppt durch Zugabe der gleichen Menge NaCl 1.8 %, also durch Herstellung eines isoosmotischen Milieus.

In der graphischen Darstellung sind die Werte jedes einzelnen der insgesamt 8 Patienten eingetragen.

Die Ordinate gibt die Höhe der Histaminfreisetzung in Prozent der Gesamtfreisetzung, d.h. vom 100 %-Wert, an. Auf der Abszisse sind die Zeiträume in Minuten aufgetragen. Dem Nullpunkt der Abszisse entspricht die Höhe des "Spontan"-Release, d.h. dem Medium TCM - Puffer.

Es zeigte sich, daß die Histaminfreisetzung ausgehend vom "Spontan"-Release mit zunehmender Aqua dest.- Einwirkung steil anstieg, sodaß in den meisten Fällen nach spätestens 10 min. die maximalen Werte erreicht wurden (zwischen 80 und 100 %).

Bei 2 der 3 Patienten mit atopischen Erkrankungen konnte die Histaminfreisetzung nach 20 und 30 min. noch gesteigert werden auf 102.9 % bzw. 98.2 %. Damit zeigten die beiden Patienten auch die insgesamt höchste Histaminfreisetzung durch Stimulation mit Aqua dest. Der dritte Atopiker zeigte nach maximaler Stimulation (30 min. Aqua dest.) mit 82.7 % ähnliche Werte wie die beiden Patienten mit Urtikaria (82 % und 84.3 %).

Die drei Normalpersonen erreichten nach 30 min. eine Freisetzung von 86.5 %, 91.9 % und 92.6 %.

Wertetabelle zur graphischen Darstellung der osmotischen
Stimulation mit Aqua dest.

Patient	SR	100% ng/ml	Aqua dest.- Einwirkung in min.						
			1	2	3	5	10	20	30
N	13.0	19.8	11.1	15.4	48.2	79.6	87.0	87.0	92.6
N	5.3	20.5	7.1	15.9	76.8	98.8	97.1	90.0	86.5
N	8.4	37.6	8.1	9.7	69.8	94.2	100	100	91.9
A (Nr3)	0.9	16.9	2.8	4.2	30.0	86.9	84.8	86.9	82.7
A (Nr18)	8.0	24.6	9.2	23.2	72.5	89.9	92.8	100	100
A (Nr21)	3.8	18.6	5.7	6.9	41.2	90.0	91.9	95.7	98.2
U (Nr30)	8.7	6.6	42.1	89.5	84.3	78.9	84.3	84.3	84.3
U (Nr34)	13.1	19.9	3.3	9.9	42.6	78.7	82.0	80.3	82.0

Bem: Die Mittelwerte der Aqua-dest.-bedingten Histaminfreisetzung sind in % der Gesamthistaminfreisetzung (100%-Wert) angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release (TCM-puffer)

Abb.22 Stimulation mit Aqua dest.

1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 min

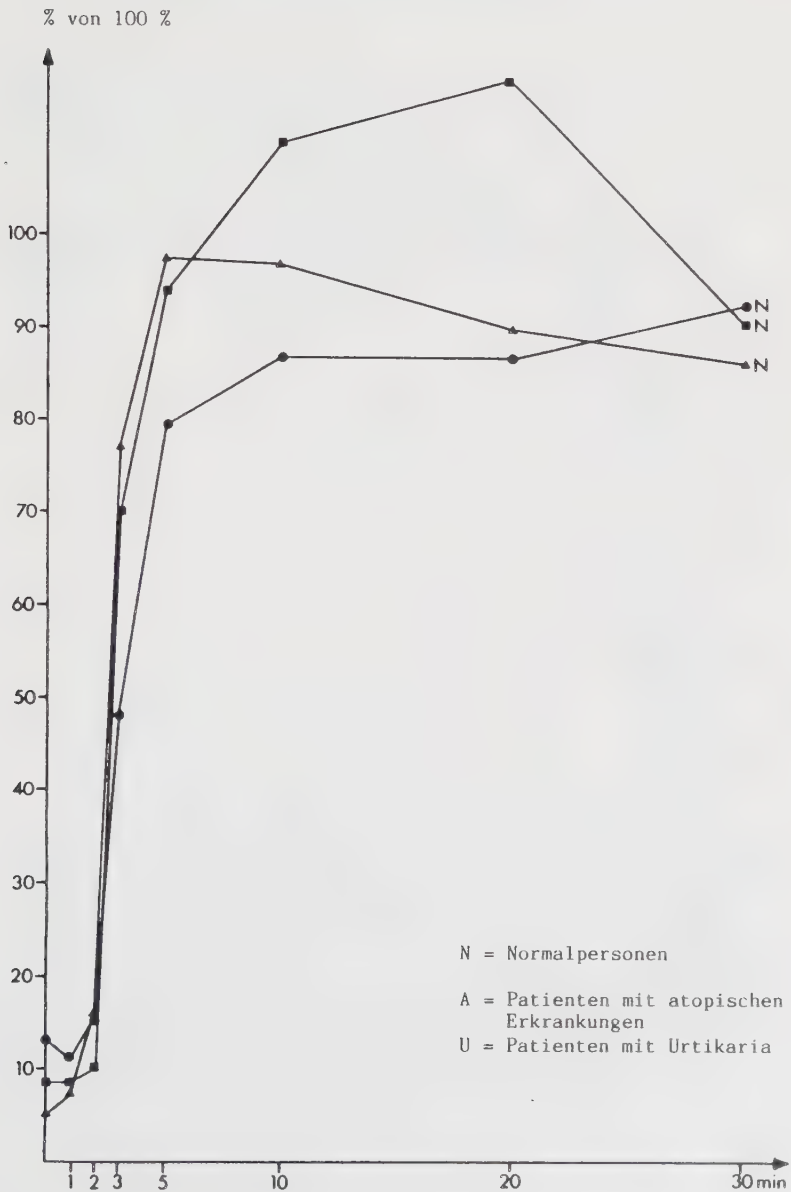
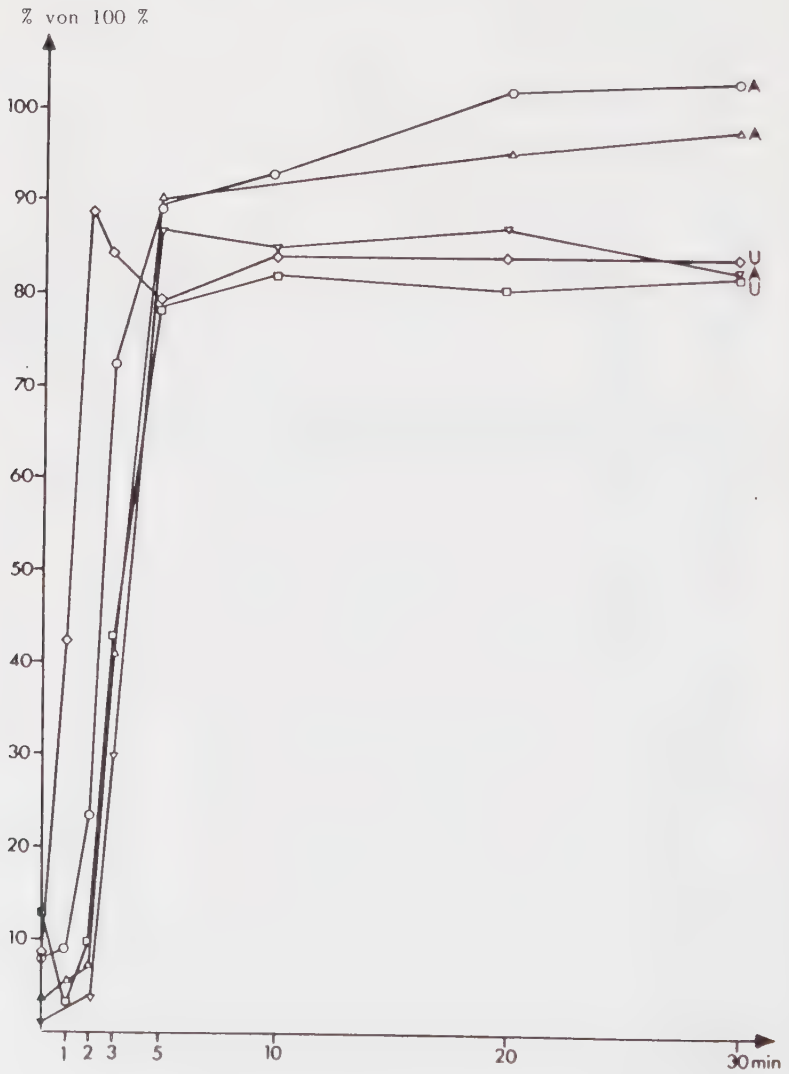


Abb.23 Stimulation mit Aqua dest.

1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 min



5.5 Ergebnisse der Stimulation mit Mannit

Hierbei wurden die Zellen der Probanden dem Medium Mannit in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt:

1, 5, 7.5 und 10 %.

Bei 2 Patienten, einer Normalperson und einem Atopiker, wurde eine zusätzliche Probe bereitgestellt, wobei die Zellen im ursprünglichen Medium TCM - Puffer belassen und lediglich 100 μ l Mannit 10 % zugefügt wurden. Es zeigte sich keine nennenswerte Steigerung der Histaminfreisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release, im Gegensatz zur Stimulation in 0.6 ml Mannit 10 %:

Patienten	"Spontan"- Release	0.5 ml Zell- suspension (inTCM)+ 100 μ l Mannit 10 %	Zellsuspension in 0.6 ml Mannit 10 %
N	7.5 %	12.0 %	39.6 %
A (Nr.)	6.7 %	6.7 %	60.6 %

Bemerkung: Alle Werte sind in Prozent der Gesamt-Histaminfreisetzung (= 100%-Wert) angegeben.

Bei der graphischen Darstellung der osmotischen Stimulation mit Mannit wurden die Werte aller insgesamt 8 Patienten in ein Koordinatensystem eingetragen.

Die Ordinate gibt die Histaminfreisetzung in Prozent der Gesamtfreisetzung an, die Abszisse die verschiedenen Konzentrationen von Mannit.

Es fällt auf, daß das Medium Mannit 1% und 5% gegenüber dem "Spontan"-Release (= Medium TCM-Puffer, Nullpunkt der Abszisse) eine niedrigere Histaminfreisetzung bewirkt; erst bei Stimulation mit Mannit 7.5 % übersteigt sie in

den meisten Fällen den "Spontan"-Release. In allen Fällen bewirkte erst Mannit 10% die maximale Histaminfreisetzung: Die mit Abstand höchsten Werte (60.6% und 61.3%) wurden von Atopikern erzielt, allerdings auch die niedrigsten Werte (3.6 % und 11.6 %).

Bei den 3 Normalpersonen betrug die Histaminfreisetzung nach Stimulation mit 10% Mannit 35.3%, 36.1% und 39.6% der Gesamtfreisetzung.

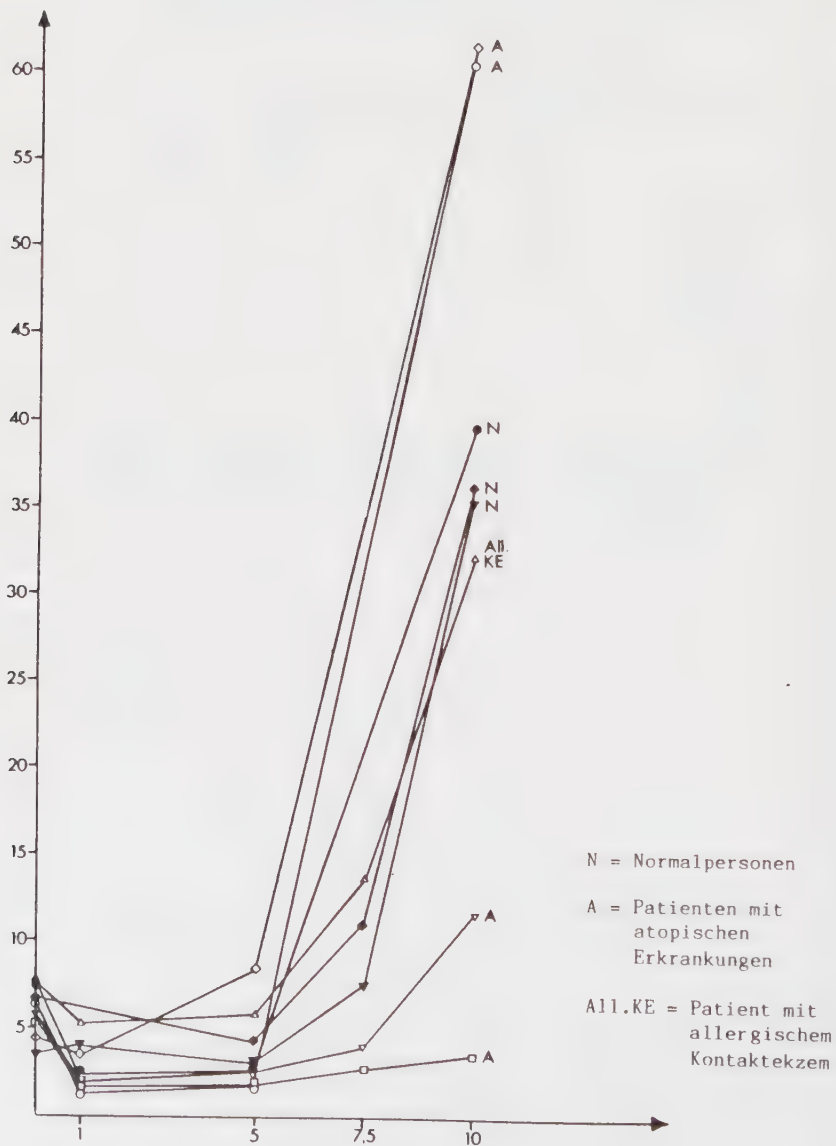
Wertetabelle zur graphischen Darstellung der osmotischen
Stimulation mit Mannit-Lösung

Patienten	SR	100% ng/ml	Mannit- Konzentrationen			
			1%	5%	7.5%	10%
N	7.5	26.8	2.2	2.7		39.6
N	3.6	25.3	4.1	3.1	7.6	35.5
N	6.7	38.9		4.3	11.0	36.1
A (Nr1)	5.4	14.8	1.8	1.8	2.7	3.9
A (Nr5)	6.7	19.6	1.2	1.8		60.6
A (Nr19)	5.8	20.3	1.9	2.6	4.2	11.6
A (Nr20)	4.5	46.3	3.5	8.3	34.5	61.3
All.KE (Nr46)	7.7	41.9	5.2	5.8	13.5	32.1

Bem: Die Mittelwerte der Mannit-bedingten Histaminfreisetzung sind in % der Gesamthistaminfreisetzung (100%-Wert) angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release (in TCM-Puffer).

Abb.24 Stimulation mit Mannit

1, 5, 7.5 und 10 %



6. UVA - induzierte Freisetzung von Histamin, β -Glucuronidase und LDH.

6.1 Patienten und Methoden

Bei diesen Versuchen wurden die Zellsuspensionen in zwei verschiedene Reaktionsgefäße gefüllt, um mögliche Abhängigkeiten von der bestrahlten Oberfläche zu untersuchen. Hierzu dienten zum einen die üblichen Analysenröhrchen, die 0.6 ml Flüssigkeit (0.5 ml Zellsuspension, 100 μ l TCM-Puffer) enthielten. Sie haben einen Innendurchmesser von 1 cm; es errechnet sich also eine bestrahlte Oberfläche von 0.78 cm^2 . Die gemessene Füllhöhe betrug 1 cm.

Zum anderen wurden Makrotiterplatten verwendet, deren Vertiefungen einen Innendurchmesser von 3.5 cm aufweisen. Daraus ergibt sich eine bestrahlte Oberfläche von 9.62 cm^2 . Die Vertiefungen mußten mit je 0.7 ml Flüssigkeit gefüllt werden (0.5 ml Zellsuspension, 200 μ l TCM-Puffer), sodaß ihr Boden gerade bedeckt war. Die Füllhöhe war also äußerst gering und konnte schlecht gemessen werden; rechnerisch ergab sich ein Wert von 0.7 mm.

Es wurde mit Dosen von 10J und $20\text{J}/\text{cm}^2$ bestrahlt; höhere Dosen konnten nicht angewendet werden, da sonst die Flüssigkeit in den Makrotiterplatten verdunstete.

(Eine Dosissteigerung wurde über eine höhere Bestrahlungszeit erreicht).

Somit traf auf die Zellsuspension in den Analysenröhrchen (Oberfläche 0.78 cm^2) eine Energie von 7.8 J bzw. 15.6 J. Die Zellen in den Makrotiterplatten (Oberfläche 9.62 cm^2) wurden dagegen einer Energie von 96,2 J bzw. 192.4 J ausgesetzt.

Das Schwergewicht der Untersuchungen lag auf der Histaminbestimmung. Bei einigen Patienten wurde auch β -Glucuronidase und LDH gemessen, um festzustellen, inwieweit die

Mediatorfreisetzung durch eine aktive Zelleistung bzw. durch eine Zerstörung der Zellen bedingt ist.

Die Bestrahlung mit UVA 10J und 20J/cm² wurde an Zellen von insgesamt 56 Patienten durchgeführt. Bei allen wurde die Freisetzung von Histamin bestimmt, bei 24 Patienten zusätzlich eine β -Glucuronidase-Bestimmung durchgeführt und von diesen wiederum bei 7 Patienten zusätzlich die LDH-Freisetzung gemessen.

Gegenstand der Untersuchungen war in erster Linie der Vergleich der Mediatorfreisetzung bei verschiedenen großen bestrahlten Oberflächen; daher wurde vor allem Blut von Normalpersonen verwendet:

- 40 Normalpersonen (N)
- 9 Patienten mit allergischen Erkrankungen (All.)

davon:

- 5 Patienten mit atopischen
Erkrankungen
(Nr. 4, 11, 14, 22, 23)
- 2 Patienten mit Allergie gegen
Bienen- und Wespengift
(Nr. 25 und 26)
- 2 Patienten mit allergischem
Kontaktekzem (Nr. 44)

Alle diese Patienten wurden wegen der geringen Fallzahl nicht gesondert behandelt, sondern zu der Gruppe Allergische Erkrankungen (All.) zusammengefaßt.

- 2 Patienten mit Urtikaria (U)
(Nr. 33 und 37)
- 6 Patienten mit Photodermatosen (Ph)
(Nr. 23, Nr. 38 - 42).

Da nicht bei allen Patienten jede Stimulation durchgeführt wurde, lassen sie sich folgendermaßen aufteilen:

1. Histaminfreisetzung

Patienten	A-Röhrchen		M-Platten		A-Röhrchen + M-Platten 10J + 20J
	10J	20J	10J	20J	
N	24	22	36	26	19
All.	7	7	8	5	4
U	1	-	-	1	-
Ph	3	3	6	5	3
Summe n=	35	32	49	36	27

In der Spalte der Makrotiterplatten ist eine Patientin (Nr. 23) doppelt aufgeführt: bei Allergikern und Photo-dermatosen, da die Patientin ein atopisches Ekzem und eine polymorphe Lichtdermatose aufwies.

Bemerkung: Die letzte Spalte gibt an, bei wievielen Patienten sämtliche Untersuchungen durchgeführt wurden, also Stimulation in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten, jeweils bei 10 und 20 J/cm²

2. β -Glucuronidase-Freisetzung

Patienten	A-Röhrchen		M-Platten		A-Röhrchen + M-Platten 10J + 20J
	10J	20J	10J	20J	
N	15	13	14	14	13
All	4	4	4	4	4
U	1	-	-	-	-
Ph	2	2	3	3	2
Summe n=	22	19	21	21	19.

3. LDH - Freisetzung

Patienten	A-Röhrchen		M-Platten		A-Röhrchen + M-Platten
	10J	20J	10J	20J	10J + 20J
N	6	6	6	6	6
Ph	-	-	1	1	-
Summe n=	6	6	7	7	6

6.2 Fragestellungen:

Sie sind identisch für die Freisetzung von Histamin, β -Glucuronidase und LDH.

Zuerst wurde der Effekt der Bestrahlung im Vergleich zum "Spontan"-Release untersucht; letzterer wurde daher nicht von den Stimulationswerten subtrahiert. Hierbei wurde nach Analysenröhrchen und Makrotiterplatten getrennt, wobei jeweils alle Patienten einer Bestimmungsmethode zusammengefaßt wurden. Lediglich bei der Histaminbestimmung ergaben sich genügend Fallzahlen, sodaß auch nach Erkrankungen differenziert werden konnte:

a) Vergleich:

"Spontan"-Release mit UVA 10J -induz.HR

"Spontan"-Release mit UVA 20J -induz.HR

- bei allen Patienten

- bei Histaminbestimmung zusätzlich gesondert bei

N, All, U, Ph.

Nun erfolgte die Untersuchung der Haupt-Fragestellung:

Wie groß ist der Unterschied der Histamin-, β -Glucuronidase- und LDH-Freisetzung in Abhängigkeit der bestrahlten Oberfläche, d.h. bei Bestrahlung in Analysenröhr-

chen bzw. in Makrotiter-Platten ?

Der "Spontan"-Release wurde hierbei einmal von den Stimulationswerten subtrahiert. Daneben wurde der "Spontan"-Release in den beiden verschiedenen Reaktionsgefäßen verglichen:

b) Vergleich:

"Spontan"-Release	Rö mit Pl
UVA 10J- induz. HR	Rö mit Pl
UVA 20J- induz. HR	Rö mit Pl.
- bei allen Patienten	
- bei Histaminbestimmung zusätzlich gesondert bei	
N, All, U, Ph.	

Des weiteren interessierte die Frage, ob verschiedene Patientengruppen im Vergleich zu Normalpersonen unterschiedlich auf Bestrahlung reagieren. Dies konnte nur für die Histaminfreisetzung untersucht werden, da nur hier genügend Probanden für die einzelnen Erkrankungen zur Verfügung standen:

Es erfolgte Subtraktion des "Spontan"-Release.

c) Vergleich:

Rö: "Spontan"-Release	
10J	
20J	N mit All.
Pl: "Spontan"-Release	N mit U
10J	N mit Ph
20J.	

Die nächste Fragestellung beschäftigt sich mit der Dosisabhängigkeit, d.h. ob bei Bestrahlung mit UVA 20 J gegenüber 10 J/cm² eine Steigerung der Histamin-, β -Glucuronidase- und LDH- Freisetzung erzielt werden konnte:

d) Vergleich:

Rö: 10 J mit 20 J ind. 1.) bei allen Patienten

Pl: 10 J mit 20 J HR 2.) bei Histaminbestimmung

zusätzlich gesondert:

N, All, Ph

Der "Spontan"-Release wurde von den Stimulationswerten abgezogen.

Bemerkung:

Allgemein ist zu sagen, daß eventuelle negative Werte, die sich durch den Abzug des "Spontan"-Release ergaben, gleich Null gesetzt wurden.

Lediglich bei der β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung ergaben sich häufiger negative Werte, sodaß diese als solche in die Statistik miteinbezogen wurden.

HR = Histamin-Release

Rö = Analysenröhrchen

Pl = Makrotiterplatten

6.3 Ergebnisse der Histaminbestimmung

Zu a) UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

- Betrachtet man die Histaminfreisetzung in den Analysenröhrchen, so ergab sich bei allen Patientengruppen weder bei Bestrahlung mit UVA 10 J/cm^2 , noch bei 20 J/cm^2 ein signifikanter Unterschied gegenüber dem "Spontan"-Release.

Bei den Normalpersonen betrug der "Spontan"-Release 3.9 % der Gesamthistaminfreisetzung, gegenüber 4.6 % für 10 J/cm^2 und 4.9 % für 20 J/cm^2 .

Bei den Patienten mit allergischen Erkrankungen war

der "Spontan"-Release etwas höher, nämlich 7.2 %, während für UVA 10 J bzw. 20 J/cm² Werte von 5.4 % bzw. 8.3 % erreicht wurden. Die Patienten mit Photodermatosen zeigten einen "Spontan"-Release von 2.7 %, bei Bestrahlung mit UVA 10 J/cm² und 20 J/cm² jeweils einen Wert von 2.6 %. Aufgrund der kleinen Fallzahl (n = 3) konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Das gleiche gilt für den Patienten mit Urtikaria ("Spontan"-Release 4.7 %, UVA 10 J/cm² 4.7 %), bei dem nur mit der Dosis 10 J/cm² bestrahlt worden war.

- Untersuchte man jedoch die Histaminfreisetzung in den Makrotiterplatten, so zeigte sich bei den Normalpersonen nach Bestrahlung mit beiden UVA-Dosen eine hochsignifikante Steigerung der Freisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release. Letzterer war ebenfalls stark angestiegen mit 33.5 %; die Werte für UVA 10 J bzw. 20 J/cm² betrugen 44.6 % und 44.8 %.

Für die Patienten mit allergischen Erkrankungen ließen sich die in ähnlicher Richtung auftretenden Unterschiede wohl wegen der geringen Fallzahl nicht nachweisen: für n = 8 war der Unterschied zwischen dem "Spontan"-Release von 34.6 % und dem Wert für UVA 10 J/cm² mit 43.6 % nicht signifikant. Bei der Bestrahlung mit 20 J/cm² standen nur 5 Patienten zur Verfügung, sodaß keine statistische Auswertung möglich war. Gleiches gilt für die Patienten mit Photodermatosen: Die beobachtete Steigerung gegenüber dem "Spontan"-Release (34.9 %) bei Bestrahlung mit 10 J/cm² (45.0 %) war nicht signifikant; an der Bestrahlung mit 20 J hatten ebenfalls nur 5 Patienten teilgenommen.

- Um den Unterschied der Histaminfreisetzung bei Bestrahlung in Analysenröhrchen und in Makrotiterplatten besonders deutlich zu machen, wurden zur Erzielung größerer Fallzahlen alle Probandengruppen zusammengefaßt.

So ergab sich für die Bestrahlung in Analysenröhrchen für die Dosis UVA 10 J/cm^2 eine Probandenzahl von $n = 35$, für 20 J/cm^2 von $n = 32$.

Bei Bestrahlung in Makrotiterplatten standen für UVA 10 J/cm^2 49 Probanden zur Verfügung, für 20 J/cm^2 36 Probanden. Vergleicht man nun die Histaminfreisetzung nach Bestrahlung mit dem "Spontan"-Release, so zeigte sich in den Analysenröhrchen kein signifikanter Unterschied bei beiden Dosen, während er in den Makrotiterplatten beide Male hochsignifikant war ($p = 0.001$).

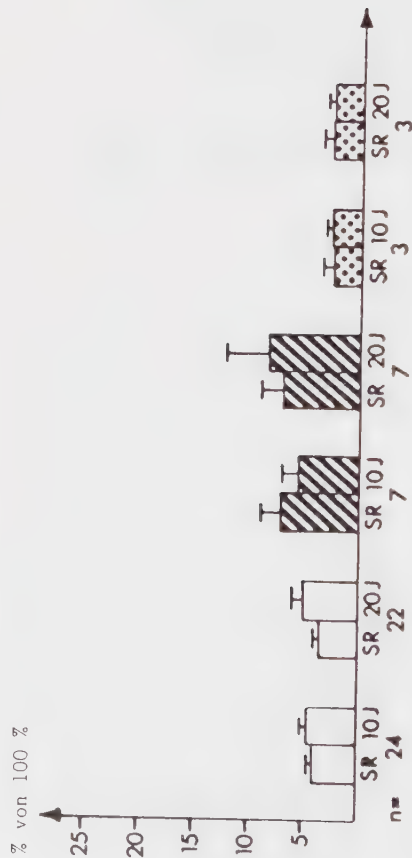
Tabelle 27: Zu a. UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen
(Analysenröhrchen)

Patienten	N		All		Ph		U
	n=24 SR	n=22 SR	n=7 SR	n=7 SR	n=3 SR	n=3 SR	n=1 SR
M	3.9 4.6	3.7 4.9	7.2 5.4	7.2 8.3	2.7 2.6	2.7 2.6	4.7 4.7
+S	2.7 3.2	2.7 5.3	4.8 4.0	4.8 10.3	1.9 0.9	1.9 1.2	
SEM	0.5 0.7	0.6 1.1	1.8 1.5	1.8 3.9	1.1 0.5	1.1 0.3	
p=	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamtfreisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.25: Zu a. UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

(Analysenrohrechen)



Zugehörige Wertetabelle:
Tabelle 27

□ N = Normalpersonen
 ▨ A = Patienten mit atopischen Erkrankungen
 ▤ Ph = Patienten mit Photodermatosen
 n = Anzahl der Patienten
 SR = "Spontan"-Release
 10J = UVA 10J/cm²
 20J = UVA 20J/cm²

Tabelle 28: Zu a. UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

(Makrotiterplatten)

Patienten	N		All		Ph		U
	n=36 SR	n=26 SR	n=8 SR	n=5 SR	n=6 SR	n=5 SR	
	10J	20J	10J	20J	10J	20J	n=1 SR 20J
M	33.5 44.6	31.7 44.8	34.5 43.6	46.2 41.1	34.9 45.0	34.1 41.9	20.6 61.8
+S	17.1 24.5	16.8 18.9	26.9 20.2	28.0 18.3	12.5 23.1	13.8 11.6	
SEM	2.9 4.2	3.4 3.8	9.5 7.1	12.5 8.2	5.1 9.5	6.2 5.2	
p=	0.001	0.001	n.s.		n.s.		

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb. 26: Zu a. UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen

(Makrotyterplatten)

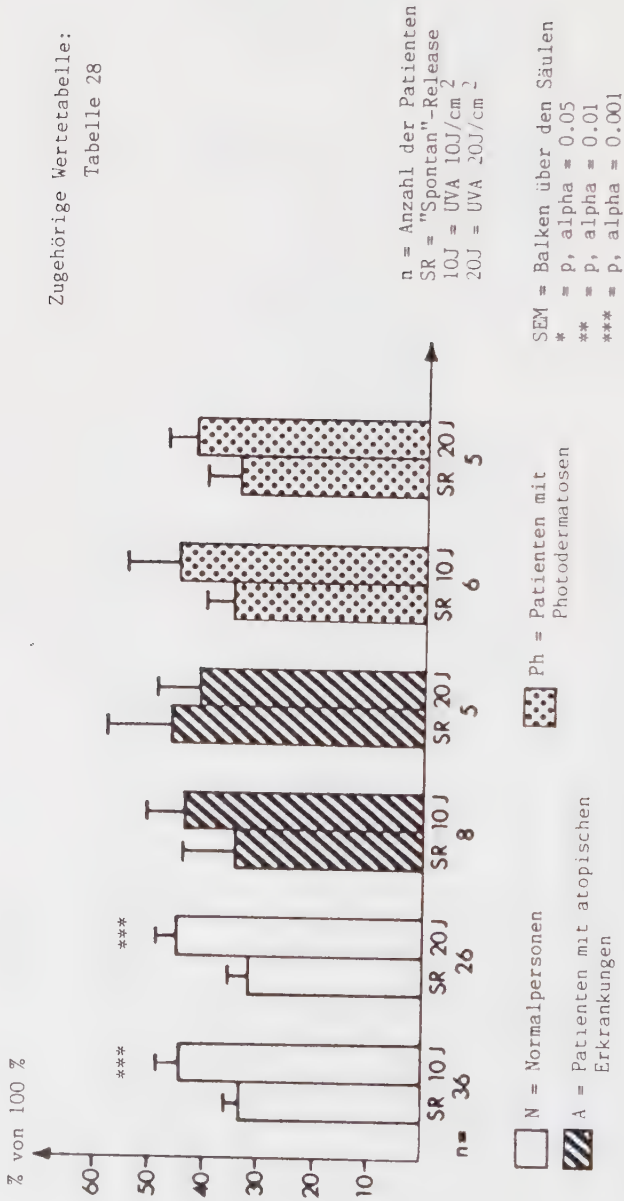


Tabelle 29: Zu a. UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

Zusammenfassung aller Probanden
jeweils bei Analysenröhrchen
und Makrotiterplatten

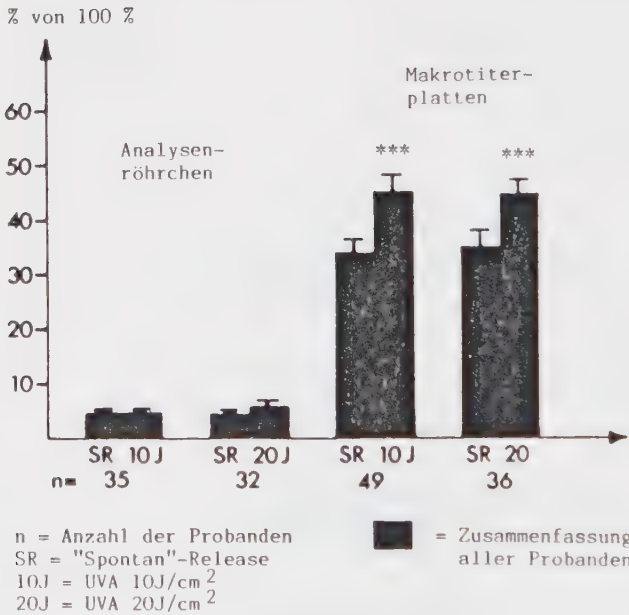
	Analysenröhrchen				Makrotiterplatten			
	n=35 SR 10J		n=32 SR 20J		n=49 SR 10J		n=36 SR 20J	
M	4.5	4.6	4.4	5.5	34.3	45.2	35.0	44.6
+S	3.3	3.2	3.4	6.5	18.2	23.1	18.2	17.0
SEM	0.6	0.5	0.6	1.1	2.6	3.3	3.0	2.8
p=	n.s.		n.s.		0.001		0.001	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; ohne Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.27: Zu a. UVA-induzierte Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

Zusammenfassung aller Probanden jeweils bei Analysenröhrchen und Makrotiterplatten

Zugehörige Wertetabelle:
Tabelle 29



SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Zu b) Vergleich des "Spontan"-Release in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten.

Bei den Normalpersonen zeigte sich hierbei ein signifikant höherer "Spontan"-Release in den Makrotiterplatten mit 33.5 % der Gesamthistaminfreisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release in Analysenröhrchen mit 3.5 % ($p = 0.0001$).

Derselbe Effekt fand sich auch bei Patienten mit allergischen Erkrankungen und Photodermatosen, nur konnte infolge zu geringer Fallzahlen keine statistische Auswertung vorgenommen werden. Bei den 4 Patienten mit allergischen Erkrankungen betrug der "Spontan"-Release in Analysenröhrchen 4.7 % und in Makrotiterplatten 51.8 %. Bei 3 Patienten mit Photodermatosen erreichte er 2.7 % in Analysenröhrchen gegenüber 41.8 % in Makrotiterplatten.

Zu b) Vergleich der UVA-induzierten Histaminfreisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten

- Für die Dosis UVA 10 J/cm^2 ergab sich bei den Normalpersonen eine signifikant höhere Histaminfreisetzung in Makrotiterplatten (16.4 %) als in Analysenröhrchen (1.2 %) $p = 0.01$.

Bei den 4 Patienten mit allergischen Erkrankungen war der Unterschied allerdings nicht so deutlich: Die Freisetzung in Analysenröhrchen betrug 1.3 %, gegenüber nur 4.9 % in Makrotiterplatten. Dies liegt an dem hohen "Spontan"-Release dieser Patienten (51.8 %, s.o.), welcher von den Stimulationswerten subtrahiert wurde. Dieser hohe Durchschnittswert war durch den extrem hohen "Spontan"-Release eines der beiden Biene-Wespe-Allergiker zustandegekommen (88.6 %). Die Patienten mit Photodermatosen ($n = 3$) zeigten ähnliche

Werte wie die Normalpersonen mit einer Freisetzung von 0.3 % in Analysenröhrchen und 18.6 % in Makrotiterplatten .

- Die Bestrahlung mit UVA 20 J/cm^2 erbrachte bei den Normalpersonen ebenfalls eine mit 12.9 % signifikant erhöhte Histaminfreisetzung in Makrotiterplatten, gegenüber 1.6 % in Analysenröhrchen ($p = 0.001$). Auch die Patienten mit allergischen Erkrankungen und Photodermatosen zeigten vergleichbare Ergebnisse, wie bei Stimulation mit UVA 10 J/cm^2 beschrieben. Aufgrund der geringen Probandenzahl konnte jedoch bei ihnen keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

- Abschließend wurden auch hier alle Probanden zusammengefaßt: Sowohl für den "Spontan"-Release ($n = 27$), als auch für die Bestrahlung mit UVA 10 J/cm^2 ($n = 27$) ergab sich eine signifikant höhere Histaminfreisetzung in Makrotiterplatten, als in Analysenröhrchen ($p = 0.001$).

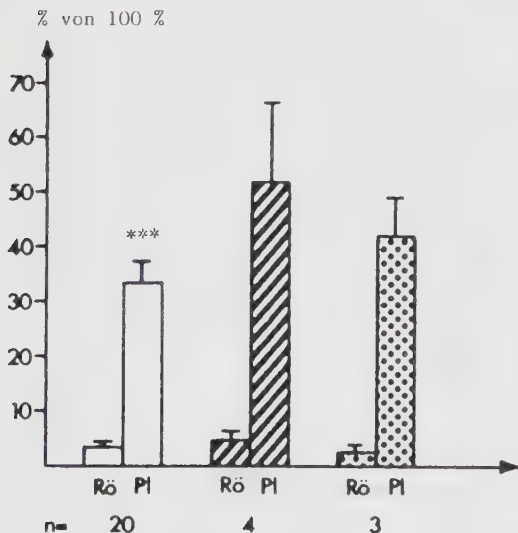
Am deutlichsten zeigt sich dieser Unterschied beim "Spontan"-Release (37.1 %), weniger deutlich nach UVA 10 J/cm^2 und 20 J/cm^2 (14.9 % bzw. 11.7 %). Es muß aber bedacht werden, daß von den Stimulationswerten der "Spontan"-Release ja subtrahiert wurde und sein Anteil an der Histaminfreisetzung somit wegfällt.

Tabelle 30: Zu b. Vergleich des "Spontan"-Release in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten bei verschiedenen Erkrankungen

Patienten	N		All.		Ph	
	n=20		n=4		n=3	
	Rö	Pl	Rö	Pl	Rö	Pl
M	3.5	33.5	4.7	51.8	2.7	41.8
+S	2.8	17.9	3.8	28.9	1.9	12.5
SEM	0.6	4.0	1.9	14.5	1.1	7.2
p=	0.001					

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben.

Abb.28: Zu b. Vergleich des "Spontan"-Release in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten bei verschiedenen Erkrankungen



Zugehörige Wertetabelle:
Tabelle 30

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

n = Anzahl der Patienten

Rö = Analysenröhrchen

Pl = Makrotiterplatten

□ N = Normalpersonen

▨ A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

▤ Ph = Patienten mit Photodermatosen

Tabelle 31: Zu b. Vergleich der UVA-induzierten Histaminfreisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten bei verschiedenen Erkrankungen

UVA 10J/cm²

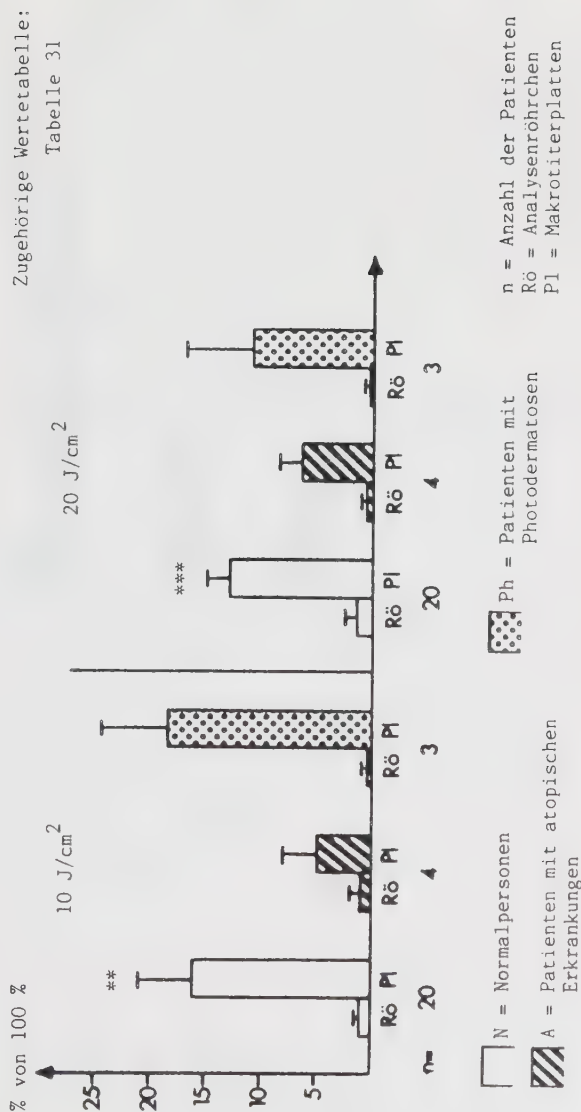
Patienten	N n=20		All. n=4		Ph n=3	
	Rö	Pl	Rö	Pl	Rö	Pl
M	1.2	16.4	1.3	4.9	0.3	18.6
+S	2.0	22.6	1.6	6.1	0.6	10.5
SEM	0.5	5.1	0.8	3.1	0.3	6.1
p=	0.01					

UVA 20J/cm²

Patienten	N n=20		All. n=4		Ph n=3	
	Rö	Pl	Rö	Pl	Rö	Pl
M	1.6	12.9	0.7	6.5	0.2	11.0
+S	4.6	10.0	0.9	4.7	0.4	10.0
SEM	1.0	2.2	0.5	2.3	0.2	5.8
p=	0.001					

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.29: Zu b. Vergleich der UVA-induzierten Histaminfreisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten bei verschiedenen Erkrankungen



n = Anzahl der Patienten
 Rö = Analysenröhrchen
 Pl = Makrotiterplatten
 SEM = Balken über den Säulen
 * = p, alpha = 0.05
 ** = p, alpha = 0.01
 *** = p, alpha = 0.001

Tabelle 32: Zu b. Vergleich des "Spontan"-Release und der UVA-induzierten Histaminfreisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten

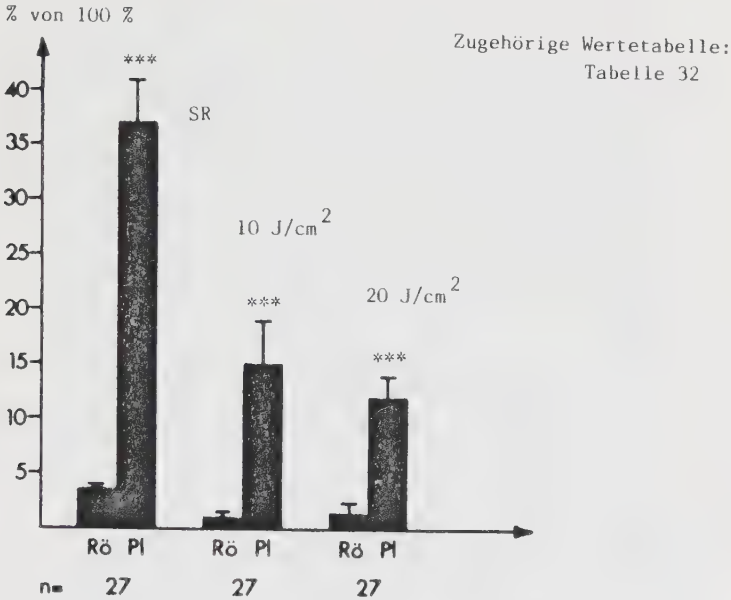
Zusammenfassung aller Probanden

Stimulation	SR n=27		10J/cm ² n=27		20J/cm ² n=27	
	Rö	Pl	Rö	Pl	Rö	Pl
M	3.6	37.1	1.1	14.9	1.3	11.7
+S	2.8	19.7	1.9	20.1	4.0	9.4
SEM	0.5	3.8	0.4	3.9	0.8	1.8
p=	0.001		0.001		0.001	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; nach Subtraktion des "Spontan"-Release von der UVA-bedingten Histaminfreisetzung.

Abb.30: Zu b. Vergleich des "Spontan"-Release und der UVA-induzierten Histaminfreisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten

Zusammenfassung aller Probanden



n = Anzahl der Patienten
Rö = Analysenröhrchen
Pl = Makrotiterplatten

= Zusammenfassung aller Probanden

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = p, alpha = 0.001

Zu c) "Spontan"-Release und UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv.

- Analysenröhrchen:

Was die Höhe des "Spontan"-Release betrifft, so fand sich bei Patienten mit allergischen Erkrankungen, Urtikaria und Photodermatosen kein signifikanter Unterschied gegenüber den Normalpersonen. Die Werte der Allergiker lagen mit 7.2 % der Gesamthistaminfreisetzung jedoch deutlich über den Werten der Normalpersonen mit 3.9 % ($\alpha = 0.1$); während der "Spontan"-Release der Patienten mit Photodermatosen darunter lag (2.7 %).

Auch nach Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm² ergab sich kein signifikanter Unterschied der Histaminfreisetzung bei Patientengruppen und Normalkollektiv. Die Werte der Patienten waren meist niedriger als die der Normalpersonen: Bei der Dosis 10 J/cm² setzten die Normalpersonen 1.1 % frei, die Patienten mit allergischen Erkrankungen 0.7 %, die Patienten mit Photodermatosen 0.3 % und der Patient mit Urtikaria 0.0 %. Stimulation mit UVA 20 J/cm² ergab folgende Werte: Für Normalpersonen 1.7 %, für allergische Patienten 2.7 % und für Patienten mit Photodermatosen 0.2 % (Diese Stimulation war bei den Patienten mit Urtikaria nicht durchgeführt worden.)

- Makrotiterplatten:

Auch hier fand sich bezüglich des "Spontan"-Release keine signifikante Änderung bei verschiedenen Erkrankungen gegenüber dem Normalkollektiv. Die Werte der Patienten mit allergischen Erkrankungen waren mit 34.5 % der Gesamthistaminfreisetzung fast identisch mit den Werten der Normalpersonen (33.6 %), gleiches gilt für die Patienten mit Photodermatosen (34.9 %). Demgegenüber zeigte der Patient mit Urtikaria einen deutlich geringeren "Spontan"-Release von 20.6 %. Ebenso wenig ließ sich nach Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm² eine signifikante Veränderung der Histaminfreisetzung bei Patientengruppen im Vergleich zum Normalkollektiv feststellen. Wie in den Analysenröhrchen, zeigten die Patienten etwas niedrigere Werte als die Normalpersonen. Letztere setzten bei 10 J und 20 J/cm² 13.0 % frei, die Allergiker und Patienten mit Photodermatosen 11.2 % bzw. 10.7 % bei 10 J/cm² und 5.2 % bzw. 10.3 % bei 20 J/cm². Lediglich der Patient mit Urtikaria wies bei UVA 20 J/cm² eine Freisetzung von 41.2 % auf; die Stimulation mit 10 J/cm² war nicht durchgeführt worden.

Tabelle 33. Zu c. "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Analysenröhrchen

Patienten	N n=24	All n=7	N n=24	Ph n=3	N n=24	U n=1
M	3.9	7.2	3.9	2.7	3.9	4.7
+S	2.7	4.8	2.7	1.9	2.7	
SEM	0.5	1.8	0.5	1.1	0.5	
alpha=	n.s.(0.1)		n.s.		n.s.	

Makrotiterplatten

Patienten	N n=38	All n=8	N n=38	Ph n=6	N n=38	U n=1
M	33.6	34.5	33.6	34.9	33.6	20.6
+S	16.7	27.0	16.7	12.5	16.7	
SEM	2.7	9.5	2.7	5.1	2.7	
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben.

Abb. 31: Zu c. "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

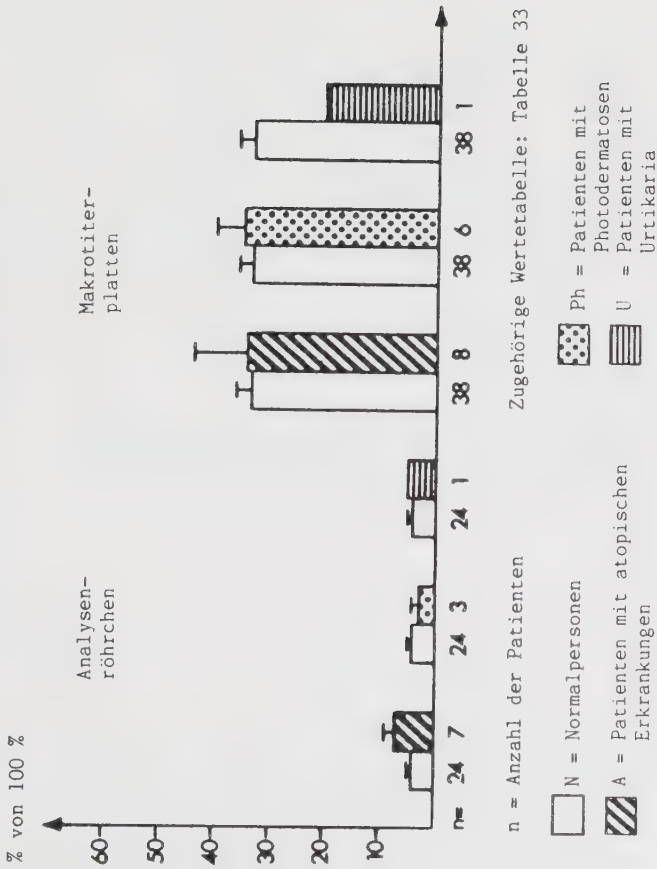


Tabelle 34: Zu c. UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Analysenröhrchen $10\text{J}/\text{cm}^2$

Patienten	N n=24	All n=7	N n=24	Ph n=3	N n=24	U n=1
M	1.1	0.7	1.1	0.3	1.1	0
+S	1.9	1.3	1.9	0.6	1.9	
SEM	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4	
alpha=	n.s.		n.s.		n.s.	

Analysenröhrchen $20\text{J}/\text{cm}^2$

Patienten	N n=22	All n=7	N n=22	Ph n=3
M	1.7	2.7	1.7	0.2
+S	4.4	6.0	4.4	0.4
SEM	0.9	2.3	0.9	0.2
alpha=	n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.32: Zu c. UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Zugehörige Wertetabelle: Tabelle 34

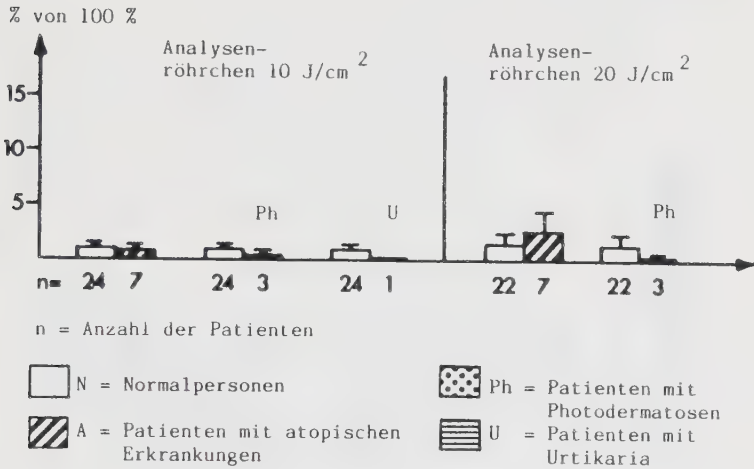


Tabelle 35: Zu c. UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Makrotiterplatten 10J/cm²

Patienten	N n=36	All n=8	N n=36	Ph n=6
M	13.0	11.2	13.0	10.7
+S	18.2	17.2	18.2	11.1
SEM	3.0	6.1	3.0	4.5
alpha=	n.s.		n.s.	

Makrotiterplatten 20J/cm²

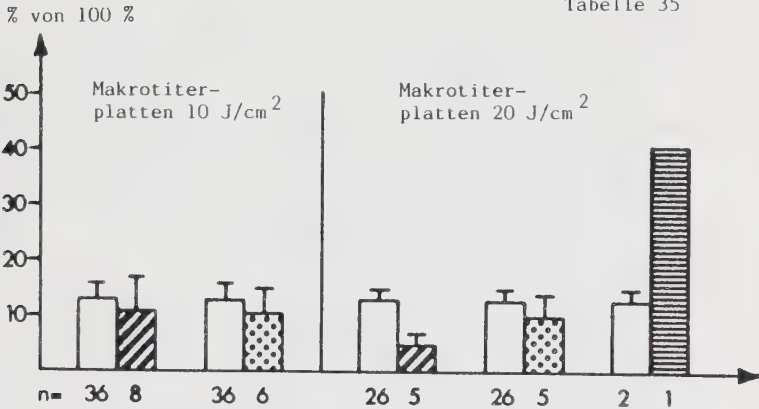
Patienten	N n=26	All n=5	N n=26	Ph n=5	N n=26	U n=1
M	13.0	5.2	13.0	10.3	13.0	41.2
+S	11.0	5.0	11.0	9.7	11.0	
SEM	2.2	2.2	2.2	4.3	2.2	
alpha=	n.s.(0.1)		n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.33: Zu c. UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum Normalkollektiv

Zugehörige Wertetabelle:

Tabelle 35



n = Anzahl der Patienten

□ N = Normalpersonen

▨ A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

▤ Ph = Patienten mit Photodermatosen

▧ U = Patienten mit Urtikaria

Zu d) UVA-induzierte Histaminfreisetzung: Vergleich der
Dosen 10 J und 20 J/cm²

- Analysenröhrchen:

Vergleicht man die beiden angewendeten Dosen bei den beteiligten Kollektiven (Normalpersonen und Patienten mit allergischen Erkrankungen), so ergibt sich kein signifikanter Unterschied der Histaminfreisetzung. Die Patienten mit Photodermatosen sind tabellarisch mit aufgeführt; ihre Werte konnten der geringen Fallzahl wegen jedoch nicht statistisch ausgewertet werden. Bei den Normalpersonen betrugen die Werte für UVA 10 J/cm² 1.2 % und für UVA 20 J/cm² 1.7 %; bei den Allergikern fand sich eine Freisetzung von 0.7 % und 2.7%; bei den Patienten mit Photodermatosen von 0.3 % und 0.2 %.

Faßt man jedoch alle Probanden zusammen (n = 32), so zeigt sich eine gerade signifikant erhöhte Histaminfreisetzung bei Stimulation mit UVA 20 J/cm² (p = 0.05).

- Makrotiterplatten:

Hierbei konnten nur die Normalpersonen statistisch ausgewertet werden, wobei sich ebenfalls für UVA 10 J/cm² mit 16.7 % der Gesamthistaminfreisetzung gegenüber UVA 20 J/cm² mit 11.9 % keine signifikante Änderung ergab. Die Patienten mit Photodermatosen setzten ebenso bei 20 J/cm² etwas weniger Histamin frei (10.3 %) als bei 10 J/cm² (12.4 %). Die Patienten mit allergischen Erkrankungen wiesen eine insgesamt etwas niedrigere Freisetzung auf von 3.9 % für UVA 10 J/cm² und 5.2 % für UVA 20 J/cm².

Bei Zusammenfassung aller Probanden (n = 33) fand sich jedoch keine signifikant erhöhte Histaminfreisetzung bei UVA 20 J/cm²; die Werte waren sogar niedriger mit 11.0 %, als bei UVA 10 J/cm² (14.6 %).

Tabelle 36: Zu d. UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen;
Vergleich der Dosen $10\text{J}/\text{cm}^2$ und $20\text{J}/\text{cm}^2$

Analysenröhrchen

Patienten	N n=22		All n=7		Ph n=3	
	10J	20J	10J	20J	10J	20J
M	1.2	1.7	0.7	2.7	0.3	0.2
+S	2.0	4.4	1.3	6.0	0.6	0.4
SEM	0.4	0.9	0.5	2.3	0.3	0.2
p=	n.s.		n.s.			

Makrotiterplatten

Patienten	N n=24		All n=5		Ph n=5	
	10J	20J	10J	20J	10J	20J
M	16.7	11.9	3.9	5.2	12.4	10.3
+S	20.7	9.8	5.7	5.0	11.6	9.7
SEM	4.2	2.0	2.6	2.2	5.2	4.3
p=	n.s.					

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.34: Zu d. UVA-induzierte Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen:
Vergleich der Dosen 10 J/cm² und 20 J/cm²

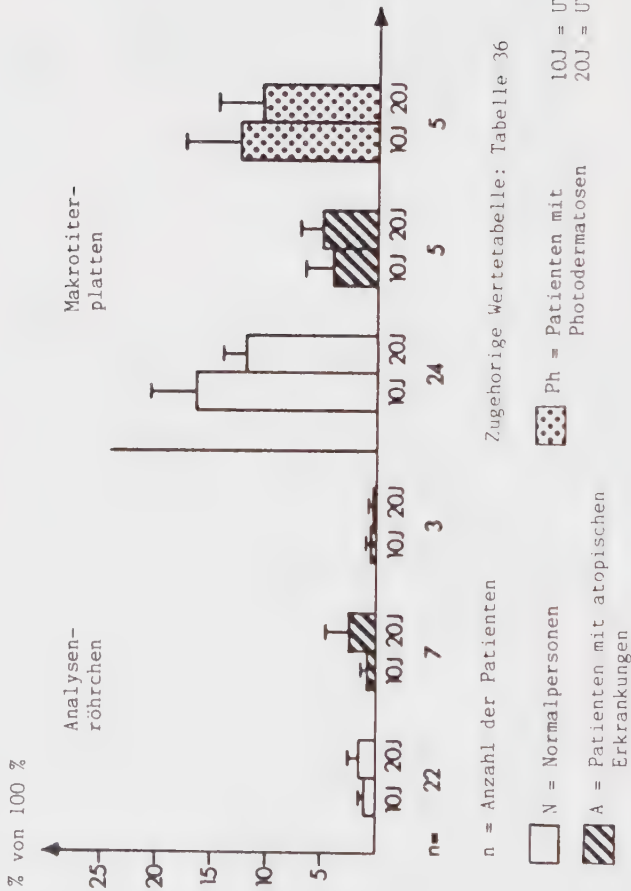


Tabelle 37: Zu d. UVA-induzierte Histaminfreisetzung:
Vergleich der Dosen 10J/cm² und 20J/cm²

Zusammenfassung aller Probanden

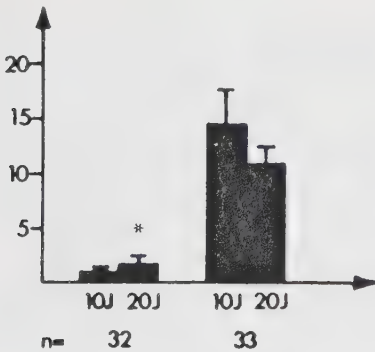
	Analysenröhrchen		Makrotiterplatten	
	n=32		n=33	
	10J	20J	10J	20J
M	1.0	1.8	14.6	11.0
+S	1.8	4.5	18.6	9.3
SEM	0.3	0.8	3.2	1.6
p=	0.05		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamthistaminfreisetzung angegeben; nach Subtraktion des "Spontan"-Release.

Abb.35: Zu d. UVA-induzierte Histaminfreisetzung:
Vergleich der Dosen 10J/cm² und 20J/cm²

Zusammenfassung aller Probanden

% von 100 %



■ = Zusammenfassung
aller Probanden

Zugehörige Wertetabelle:
Tabelle 37

n = Anzahl der Patienten

10J = UVA 10 J/cm²
20J = UVA 20 J/cm²

SEM = Balken über den Säulen

* = p, alpha = 0.05

** = p, alpha = 0.01

*** = P, alpha = 0.001

Kinetik-Versuch zum Einfluß der Verweildauer der Zellsuspension in den Makrotiterplatten

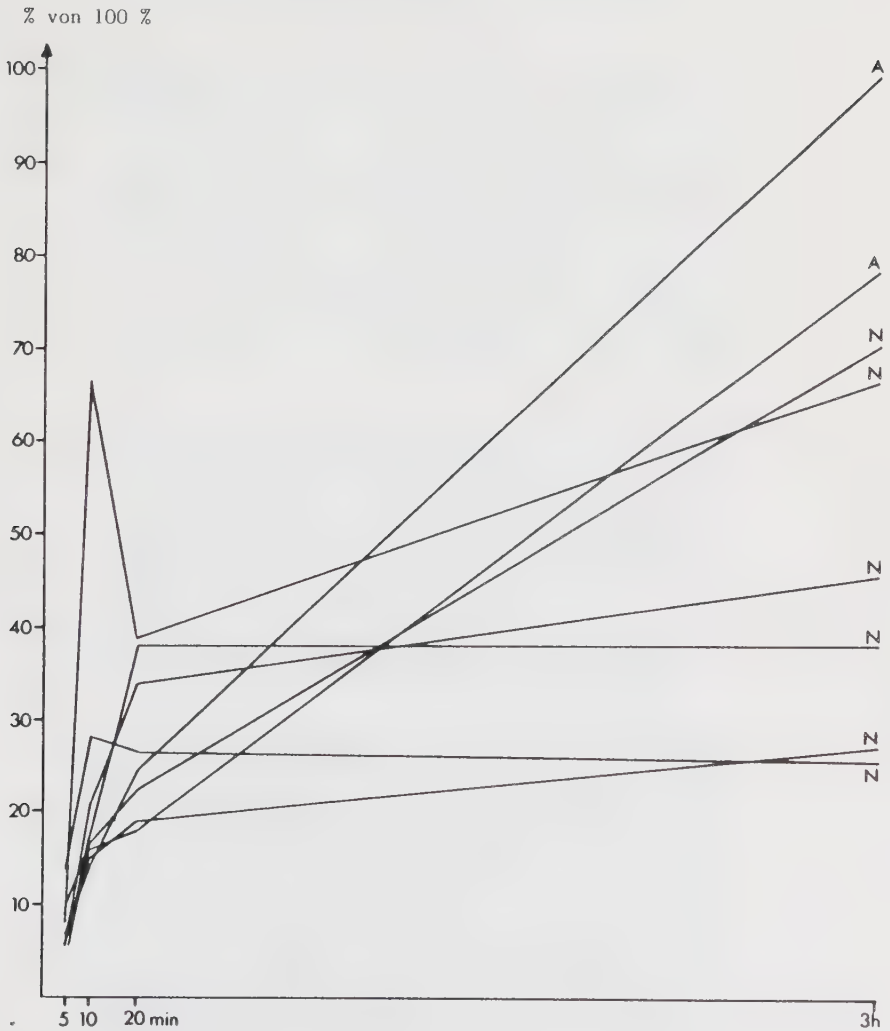
Auf der Ordinate ist die Histaminfreisetzung in % der Gesamtfreisetzung angegeben; auf der Abszisse der Zeitraum bis zur Zentrifugation der Zellsuspension.

Es zeigte sich ein sehr deutlicher Einfluß der Verweildauer der Zellsuspension auf die Histaminfreisetzung; die höchsten Werte wurden erreicht, wenn erst nach 3 h (entspricht der maximalen Dauer der Bestrahlungsexperimente) zentrifugiert wurde.

Bei einem Patienten wurde der maximale "Spontan"-Release schon nach 10 min, bei 2 Patienten nach 20 min erreicht. Die höchsten Werte traten bei 2 Atopikern auf.

Abb.36: Kinetik: Effekt verlängerter Verweildauer der Zellsuspension in Makrotiterplatten

Zentrifugation nach 5, 10, 20 min und nach 3 h



N = Normalpersonen

A = Patienten mit atopischen Erkrankungen

6.4 Ergebnisse der β -Glucuronidase - Bestimmung

Zu a) UVA-induzierte β -Glucuronidase-Freisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release.

Bei der β -Glucuronidase - Bestimmung war wegen zu geringer Fallzahlen keine Aufteilung in verschiedene Kollektive vorgenommen worden.

Unter den insgesamt 24 Probanden fanden sich 16 Normalpersonen, 4 Patienten mit allergischen Erkrankungen, 3 Patienten mit Photodermatosen und 1 Patient mit Urtikaria. Bei Betrachtung der Einzelwerte (vgl. Daten-Anhang) waren keine auffälligen Unterschiede zwischen diesen Kollektiven zu beobachten.

- Bezüglich der β -Glucuronidase-Freisetzung in Analysenröhrchen ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Histaminbestimmung: Auch hier fand sich nach Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm² kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum "Spontan"-Release, welcher 6.0 % der Gesamt- β -Glucuronidase-Freisetzung betrug. Die Werte nach Bestrahlung waren höher, nämlich 7.9 % für UVA 10 J/cm und 7.6 % für UVA 20 J/cm².
- Betrachtet man die β -Glucuronidase-Freisetzung in Makrotiterplatten, so zeigte sich, im Unterschied zur Histaminbestimmung, keine signifikante Steigerung der Freisetzung nach Bestrahlung im Vergleich zum "Spontan"-Release. Letzterer betrug 36.1 %, war also ebenfalls stark erhöht, während nach Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm² jeweils 40.6 % freigesetzt wurden. Für diesen Unterschied gegenüber den Ergebnissen des Histaminrelease kann die geringere Gesamt-Probandenzahl bei der β -Glucuronidase-Bestimmung eine Rolle spielen; allerdings ergaben sich bei der Histaminbe-

stimmung auch deutlichere Unterschiede zwischen "Spontan"-Release und Bestrahlungswerten. Dies soll durch folgende Tabelle veranschaulicht werden:

Histamin- und β -Glucuronidase-Freisetzung in Makrotiterplatten:

Histaminfreisetzung:	β -Glucuronidase-Freisetzung:
"Spontan"-Release, n = 49 34,3 %	"Spontan"-Release, n = 21 36,1 %
UVA-10 J/cm ² , n = 49 45,2 %	UVA 10 J/cm ² , n = 21 40,6 %
UVA 20 J/cm ² , n = 36 44,6 %	UVA 20 J/cm ² , n = 21 40,6 %

n bedeutet Gesamtzahl der Probanden, ohne Aufteilung in verschiedene Kollektive.

• Zu b) Vergleich des "Spontan"-Release in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten.

Ebenso wie bei der Histaminfreisetzung ergab sich ein signifikant höherer β -Glucuronidase- "Spontan"-Release in Makrotiterplatten im Vergleich zu den Analysenröhrchen. In letzteren resultierte ein Wert von 6.0 %, in den Makrotiterplatten von 38.8 %, $p = 0.001$.

Zu b) Vergleich der UVA-induzierten β -Glucuronidase-Freisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten.

Hierzu muß nochmals bemerkt werden, daß nach Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten oftmals negative Werte resultierten. Um dieses nicht unberücksichtigt zu lassen, wurden sie mit in die Statistik aufgenommen und nicht gleich Null gesetzt.

Anders als bei der Histaminfreisetzung fanden sich hierbei keine signifikanten Unterschiede der β -Glucuronidase-Freisetzung in Makrotiterplatten im Vergleich zu Analysenröhrchen, weder nach Bestrahlung mit UVA 10 J/cm^2 (A-Röhrchen und M-Platten jeweils 3.3 % der Gesamt- β -Glucuronidasefreisetzung), noch nach Stimulation mit UVA 20 J/cm^2 (A-Röhrchen 1.7 %, M-Platten 3.1 %).

Zu c) entfällt bei der β -Glucuronidase- und LDH-Freisetzung, da nicht in einzelne Kollektive unterteilt wurde.

Zu d) UVA-induzierte β -Glucuronidase-Freisetzung:

Vergleich der Dosen 10 J und 20 J/cm^2

- Analysenröhrchen:

Es konnte keine signifikante Steigerung der β -Glucuronidase-Freisetzung nach Anwendung der höheren Dosis von 20 J/cm^2 (1.7 %) gegenüber der Dosis von 10 J/cm^2 (3.3 %) beobachtet werden, eher das Gegenteil.

- Makrotiterplatten:

Hier fand sich dasselbe Resultat; die β -Glucuronidase-freisetzung für UVA 10 J/cm^2 betrug 4.5 %, für 20 J/cm^2 4.0 %.

Somit entsprachen die Ergebnisse denen der Histaminbestimmung, d.h. es ließ sich keine Dosisabhängigkeit nachweisen, weder in Analysenröhrchen, noch in Makrotiterplatten.

Bemerkung: Die oben angegebenen Werte verstehen sich nach Subtraktion des "Spontan"-Release, wobei negative Werte wiederum berücksichtigt wurden.

Tabelle 38: Zu a. UVA- induzierte β -Glucuronidase-Freisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

	Rö n=22		Rö n=19		P1 n=21		P1 n=21	
	SR	10J	SR	20J	SR	10J	SR	20J
M	6.0	7.9	6.0	7.6	36.1	40.6	36.1	40.6
+S	2.9	10.4	3.1	10.1	21.2	22.0	21.2	21.8
SEM	0.6	2.2	0.7	2.3	4.6	4.8	4.6	4.8
p=	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

Bem. Die Mittelwerte sind in % der Gesamt- β -Glucuronidase-freisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release

Tabelle 39: Zu b. Vergleich des "Spontan"-Release und der UVA-induzierten β -Glucuronidase-Freisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten

	SR n=19		10J/cm ² n=19		20J/cm ² n=19	
	Rö	P1	Rö	P1	Rö	P1
M	6.0	38.8	3.3	3.3	1.7	3.1
+S	3.1	20.5	11.7	22.8	10.7	19.6
SEM	0.7	4.7	2.7	5.2	2.5	4.5
p=	0.001		n.s.		n.s.	

Bem. Die Mittelwerte sind in % der Gesamt- β -Glucuronidase-Freisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten.

Negative Werte wurden dabei berücksichtigt.

Tabelle 40: Zu d. UVA-induzierte β -Glucuronidase-Freisetzung:
Vergleich der Dosen $10\text{J}/\text{cm}^2$ und $20\text{J}/\text{cm}^2$

	Rö n=19		P1 n=21	
	10J	20J	10J	20J
M	3.3	1.7	4.5	4.0
+S	11.7	10.7	22.4	19.1
SEM	2.7	2.5	4.9	4.2
p=	n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamt- β -Glucuronidase-Freisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release. Negative Werte wurden dabei berücksichtigt.

Die Tabellen 38-40 beziehen sich auf die Zusammenfassung aller Probanden; es erfolgte keine Aufteilung in verschiedene Kollektive.

6.5 Ergebnisse der LDH-Bestimmung

Zu a) UVA-induzierte LDH-Freisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

Auch hier konnte nicht in verschiedene Kollektive unterteilt werden. Bei den insgesamt 7 Probanden handelte es sich um 6 Normalpersonen und einen Patienten mit einer Photodermatose.

- Bezüglich der LDH-Freisetzung in Analysenröhrchen fand sich, wie bei der Histamin- und β -Glucuronidase-Bestimmung, kein signifikanter Unterschied nach Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm^2 gegenüber dem "Spontan"-Release von 10.4 % der Gesamt-LDH-Freisetzung. Die Werte für UVA 10 J und 20 J/cm^2 waren niedriger, nämlich 7.6 % bzw. 8.3 %.
- Das Ergebnis in Makrotiterplatten entsprach dem der β -Glucuronidase-Bestimmung: Auch hier konnte keine signifikante Änderung der LDH-Freisetzung nach Bestrahlung im Vergleich zum "Spontan"-Release (54.5 %) festgestellt werden. Die Werte der UVA-Bestrahlung überstiegen allerdings den "Spontan"-Release mit 74.4 % für 10 J/cm^2 und 62.7 % für 20 J/cm^2 . Dies hatte sich in den Analysenröhrchen nicht gezeigt.

Zu b) Vergleich der UVA-induzierten LDH-Freisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten.

Wie bei der β -Glucuronidasefreisetzung ergaben sich nach Subtraktion des "Spontan"-Release von den Stimulationswerten öfter negative Werte, welche als solche in der Statistik mitberücksichtigt wurden.

Im Gegensatz zur β -Glucuronidase-Bestimmung fand sich eine signifikant höhere LDH-Freisetzung nach Bestrahlung in Makrotiterplatten, als in Analysenröhrchen. Die Werte für 10 J/cm^2 betrugen - 2.9 % in Analysenröhrchen bzw. 23.4 % in Makrotiterplatten; für 20 J/cm^2 wurde eine Freisetzung von - 2.1 % bzw. 8.2 % erreicht. Das Signifikanzniveau lag beidesmal bei $p = 0.05$. Das Resultat entsprach damit dem der Histaminbestimmung.

Zu c) entfällt wegen zu geringer Fallzahlen für einzelne Kollektive.

Zu d) UVA-induzierte LDH-Freisetzung:

Vergleich der Dosen 10 J und 20 J/cm^2

- Analysenröhrchen:

Es zeigte sich keine signifikant höhere LDH-Freisetzung bei Bestrahlung mit UVA 20 J (-2.9 %) als mit UVA 10 J/cm^2 (-2.11 % der Gesamt-LDH-Freisetzung).

- Makrotiterplatten:

Es gilt dasselbe wie bei den Analysenröhrchen: Die LDH-Freisetzung für UVA 20 J betrug 19.9 %, für UVA 10 J/cm^2 8.3 %.

Somit sind die Ergebnisse denen der Histamin- und β -Glucuronidase-Bestimmung vergleichbar; auch dort ließ sich übrigens eine niedrigere Freisetzung bei 20 J/cm^2 als bei 10 J/cm^2 beobachten.

Daraus läßt sich schließen, daß ein großer Teil der Freisetzung von Histamin oder β -Glucuronidase durch zelluläre Lyse bedingt ist.

Tabelle 41: Zu a. UVA-induzierte LDH-Freisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release

	Rö n=6		Rö n=6		P1 n=7		P1 n=7	
	SR	10J	SR	20J	SR	10J	SR	20J
M	10.4	7.6	10.4	8.3	54.5	74.4	54.5	62.7
+S	8.1	2.4	8.1	2.5	23.8	18.0	23.8	23.6
SEM	3.3	1.0	3.3	1.0	9.0	6.8	9.0	8.9
p=	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

Bem. Die Mittelwerte sind in % der Gesamt-LDH-Freisetzung angegeben, ohne Subtraktion des "Spontan"-Release

Tabelle 42: Zu b. Vergleich des "Spontan"-Release und der UVA-induzierten LDH-Freisetzung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten

	SR n=7		10J/cm ² n=6		20J/cm ² n=6	
	Rö	P1	Rö	P1	Rö	P1
M	10.7	54.5	-2.9	23.4	-2.1	8.2
+S	7.4	23.8	9.8	29.7	7.5	17.7
SEM	2.8	9.0	4.0	12.1	3.0	7.2
p=	0.02		0.02		0.02	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamt-LDH-Freisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release. Negative Werte wurden dabei berücksichtigt.

Tabelle 43: Zu d. UVA-induzierte LDH-Freisetzung:
Vergleich der Dosen $10\text{J}/\text{cm}^2$ und $20\text{J}/\text{cm}^2$

	Rö n=6		P1 n=7	
	10J	20J	10J	20J
M	-2.9	-2.1	19.9	8.3
+S	9.8	7.5	28.7	16.1
SEM	4.0	3.0	10.8	6.1
p=	n.s.		n.s.	

Bem: Die Mittelwerte sind in % der Gesamt-LDH-Freisetzung angegeben, nach Subtraktion des "Spontan"-Release. Negative Werte wurden berücksichtigt.

Die Tabellen 41-43 beziehen sich auf die Zusammenfassung aller Probanden; es erfolgte keine Aufteilung in einzelne Kollektive.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener physikalischer Stimuli auf die Histaminfreisetzung menschlicher basophiler Leukozyten untersucht. Besonderes Gewicht wurde auf die alleinige Bestrahlung mit UVA gelegt, wobei unter Verwendung von zwei verschieden großen Gefäßen für die Zellsuspension eine deutliche Abhängigkeit der Histaminfreisetzung von der bestrahlten Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Die gleichzeitige Bestimmung von β -Glucuronidase und LDH nach UVA-Bestrahlung ergab ein Freisetzungsmuster, welches auf eine zytotoxische Ursache der Histaminfreisetzung schließen läßt.

Bei einigen physikalischen Stimuli zeigten die Zellen von Patienten mit atopischen Erkrankungen eine Tendenz, mehr Histamin freizusetzen als Normalpersonen; gleiches fiel auf nach Zugabe von Ca⁺⁺-Ionophore und nach immunologischer Stimulation mit Anti-IgE. Hierbei handelte es sich in erster Linie um Patienten mit atopischem Ekzem, welche auch bereits einen erhöhten "Spontan"-Release ohne jede Stimulation aufwiesen.

Eine gegenüber Normalpersonen stark erhöhte Histaminfreisetzung ließ sich bei den Leukozyten zweier Patienten mit Urtikaria nach Wärme- und Kälte-Stimulation nachweisen.

Die basophilen Granulozyten von Patienten mit allergischen Erkrankungen zeigten also insgesamt eine geringfügig erhöhte Bereitschaft zur Histaminfreisetzung nach physikalischer Stimulation. Die erhöhte "Releasability", welche bei den Patienten mit atopischem Ekzem bereits in ihrer erhöhten Spontanfreisetzung zum Ausdruck kam, scheint sich auch in der Empfindlichkeit gegen physikalische Reize niederzuschlagen.

Im folgenden sollen nun einzelne Aspekte der Arbeit speziell diskutiert werden.

1. UVA - Effekte

1.1 Bestrahlung mit UVA; historische Aspekte

Die Einteilung des ultravioletten Lichts in UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) und UVC (200-280 nm) wurde 1932 beim 2. Kongress der Comite Internationale de Lumiere beschlossen (105).

Anfang dieses Jahrhunderts wurden dem UVA gar keine oder nur geringe biologische Wirkungen zugeschrieben; Finsen zeigte jedoch schon 1899, daß gefiltertes Sonnenlicht nicht nur heilungsfördernd auf Lupus vulgaris wirkte, sondern auch Erythem und Pigmentierung erzeugte. Er benutzte eine große Glaslinse und bestrahlte zusätzlich durch eine Kupfersulfatlösung, um den Infrarot-Anteil des Sonnenlichts herauszufiltern. Urbach hat die Transmission durch eine dieser Original-Linsen gemessen und festgestellt, daß tatsächlich kein kürzerwelliges UV-Licht als 320 nm die Vorrichtung passiert (105).

Jüngling konnte 1916 Pigmentierung ohne vorausgehendes Erythem erzeugen, indem er Sonnenlicht durch Fensterglas filterte. Die ersten Versuche, diese klinischen Wirkungen bestimmten Wellenlängen zuzuordnen, unternahmen Hausser und Vahle 1921 und 1927 mittels eines Monochromators und einer Quecksilber - Bogenlampe. Sie erstellten damit das erste Aktionsspektrum für UV - Licht.

1938 bestimmte Isolde Hausser das erste Aktionsspektrum für UVA; ebenfalls mittels eines Monochromators, aber unter Verwendung einer Hoch-Intensitäts-Kohlebogenlampe, welche genügend Energie bereitstellte, um von 330-420 nm Erytheme zu erzeugen. Dieses tiefrote Erythem trat rasch auf (2-3 h) und ging rasch in Pigmentierung über. Die mittlere Erythemdosis (MED), d.h. die Dosis, bei welcher ein schwaches, aber noch leicht objektivierbares Erythem auftritt (13) betrug bei 385 nm 18 J/cm^2 (zitiert in 105).

Vergleicht man dazu die aktuelle Literatur, so finden sich UVA-Dosen für die MED von etwa 13 J/cm^2 (38) bis ca. 50 J/cm^2 (39), meist jedoch bei 20 J/cm^2 (zitiert in: 38). Gründe für diese Diskrepanzen können einmal in der Auswahl der Probanden liegen, welche verschiedene Hauttypen und damit unterschiedliche Erythemschwellen aufweisen können, zum anderen auch in der technischen Durchführung: So kommt es vor allem auf die Intensität der Lichtquelle an, denn niedrige Intensitäten bedeuten längere Bestrahlungszeiten für dieselbe Dosis, sodaß ein auftretendes Erythem möglicherweise nicht mehr erfaßt wird. Zum anderen sind genaue Angaben über das emittierte Spektrum nötig, denn in dem als UVA zusammengefaßten Bereich existieren wirksame und weniger wirksame Wellenlängen (23,38).

Mittlerweile hat sich herausgestellt, daß UVA nicht nur Soforterythem und Sofortpigmentierung hervorruft, sondern daß das Aktionsspektrum verschiedener pathologischer Lichtreaktionen ebenfalls im UVA-Bereich liegt, nämlich die Auslösung von Phototoxizität und Photoallergie, sowie von Sonnenurtikaria (6, 43, 61, 71, 98).

Diese klinischen Befunde legen in vitro-Untersuchungen an Zellen nahe, welche an der Entstehung der allergischen Symptome beteiligt sind; in dieser Arbeit sind dies die basophilen Granulozyten mit ihrer Mediatorfreisetzung. Aus dem oben Gesagten geht außerdem schon die Bedeutung der Bestrahlungsmodalitäten, wie Auswahl der Lichtquelle, Intensität und emittiertes Spektrum auf die Effekte von UVA hervor.

1.2 Methodische Aspekte

1.2.1 Auswahl der Lichtquellen

Die Beziehung zwischen Intensität und Dosis ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Dosis (J/cm}^2\text{)} = \text{Intensität (W/cm}^2\text{)} \times \text{Zeit (sec.) (1)}.$$

Das heißt also, je höhere Intensitäten eine Lichtquelle liefern kann, um so höhere Dosen sind erreichbar in kürzerer Zeit.

Fluoreszenzröhren mit Emissionsmaxima im UVB - Bereich ("fluorescent sunlamps") und UVA - Bereich ("fluorescent blacklights") werden klinisch und experimentell sehr häufig benutzt, sind preiswert und unkompliziert in der Handhabung (keine Kühlung notwendig), haben aber den Nachteil relativ geringer Intensitäten und damit längerer Bestrahlungszeiten (56). Außerdem existieren kaum UVA-emittierende Lichtquellen ohne UVB-Kontamination; zusätzliche Filterung verringert aber wiederum die Intensität (62).

Die Bereitstellung höherer Intensitäten bieten die Xenonbrenner, welche seit den fünfziger Jahren erhältlich sind. Sie emittieren das ganze Sonnenspektrum und werden deshalb vor allem experimentell als "Sonnensimulatoren" eingesetzt (2, 104). Für die Anwendung nur des UVA-Bereichs müßte die Strahlung gefiltert werden; außerdem sind sie wesentlich teurer und bei Leistungen über 1000 W sind zusätzliche Kühlsysteme erforderlich (56).

Es sei noch erwähnt, daß die Dosis auch vom Abstand der Lichtquelle zu dem zu bestrahlenden Material abhängt. Jan Alsius et al. konzipierten eine Hochintensitätslampe aus einer SP 500 W Quecksilberlampe, einem speziellen Gehäuse und wassergekühlten Filtern für den UVA- und UVB- Bereich. Die Konstruktion des Gehäuses erlaubte einen Abstand der Lichtquelle zu der bestrahlten Fläche von nur 30 mm; allerdings ergaben sich daraus nur kleine bestrahlte Areale

von 3.8 cm^2 (1). Ein Gerät mit ähnlichen Eigenschaften entwickelten Plewig et al.; ebenfalls mit direktem Hautkontakt und kleinen bestrahlten Flächen (69).

In dieser Arbeit wurde ein von Mutzhas entwickeltes Gerät mit hoher Strahlungsenergie im Bereich von 320–460 nm verwendet (UVASUN 5000). 84 % der totalen Energie liegen im UVA – Bereich (320–400 nm), mit einem Maximum von 360–390 nm und 16 % im blauvioletten Anteil des sichtbaren Lichts. Nach Mutzhas, Hölzle et al. (64) ist die UVB-Kontamination vernachlässigbar; bei Messungen der OSRAM-Laboratorien in München unter Verwendung eines Spektrophotometers und zwei Monochromatoren lag sie für den Bereich 315–320 nm unter der Nachweisgrenze. Diese Messungen korrelierten gut mit denen des CENTRA-UV-Meßgerätes von OSRAM, welches für tägliche Meßkontrollen geeignet ist und zwei Detektoren für UVA und UVB besitzt.

Allerdings zeigt der UVB-Detektor immer noch geringe Intensitäten an; dies erklärt sich nach Mutzhas et al. und nach den technischen Daten des CENTRA-UV-Meßgerätes (66) durch einen Anzeigefehler: Die Sensitivität des UVB-Detektors reicht bis in den kurzwelligen UVA-Anteil, sodaß dadurch UVA mitgemessen wird.

Das UVASUN 5000 Gerät ist fahrbar, vertikal und horizontal schwenkbar und ermöglicht bei einem Abstand von 20 cm die Bestrahlung einer Fläche von $35 \times 35 \text{ cm}$. Unter diesen Bedingungen haben Mutzhas et al. eine mittlere Intensität von 140 mW/cm^2 gemessen und bei 69 Patienten die Grenz dosis für Sofortpigmentierung bestimmt (IPD= Immediate Pigment Darkening). Sie wurde bei der Mehrzahl der Patienten für einen Abstand von 20 cm mit Dosen bis 10 J/cm^2 erreicht. Die MED (mittlere Erythemdosis) wurde nicht untersucht, da das Gerät auch Wärme erzeugt und ein Hitze-Erythem von einem UVA-bedingten Soforterythem nicht zu unterscheiden ist.

Desweiteren eignet sich das Gerät zur Provokation von phototoxischen und photoallergischen Reaktionen, sowie zur Reproduktion von polymorphen Lichtdermatosen.

1.2.2 Durchführung der Bestrahlung

In der vorliegenden Untersuchung wurden Leukozyten-Suspensionen *in vitro* bestrahlt; sowohl in Analysenröhrchen, als auch in Makrotiterplatten. Der Abstand der Proben von der Strahlungsquelle betrug 40 cm. Die Intensität bei diesem Abstand wurde mit dem CENTRA-UV-Meßgerät gemessen und betrug 58 mW/cm^2 für UVA und für UVB 0.36 mW/cm^2 .

Der für UVB gemessene Wert beruht, wie erwähnt, auf einem Anzeigefehler.

Unter diesen Bedingungen wurden UVA-Dosen von 10 J/cm^2 und 20 J/cm^2 in 3 bzw. 6 Minuten Bestrahlungszeit erreicht. Die Vertiefungen der Makrotiterplatten hatten einen Durchmesser von 3.5 cm, es ergab sich also eine bestrahlte Oberfläche von 9.62 cm^2 . 0.7 ml Zellsuspension reichten gerade aus, um den Boden der Vertiefungen zu bedecken; für die äußerst geringe Füllhöhe wurde ein Wert von 0.7 mm errechnet. Die Analysenröhrchen besaßen einen Innendurchmesser von 1 cm und damit eine bestrahlte Oberfläche von 0.78 cm^2 . Die Füllhöhe für 0.6 ml Zellsuspension wurde gemessen und betrug 1 cm.

Siladji et al. (96) haben Messungen der UV-Intensität hinter Glas und Textilien, aber auch in Wasser bestimmt und kamen zu dem Ergebnis, daß bei mittlerem Sonnenhöhenwinkel von 53 in 50 cm Wassertiefe noch 85 % Durchlässigkeit für UVA besteht. Es ist daher anzunehmen, daß bei Füllhöhen einer wäßrigen Lösung von 1 cm und 0.7 mm eine Transmission von UVA von nahezu 100% besteht und daß die suspendierten Zellen von dieser Strahlung unvermindert getroffen werden.

Darüberhinaus liefert das UVASUN-Gerät weit höhere Intensitäten für UVA als das Sonnenlicht; Mutzhas (62) zitiert hierzu die "Commission Internationale De L'Eclairage", welche die Intensität von UVA bei einer Sonnenhöhe von 90° , wolkenlosen Bedingungen und Luftmasse = 1 mit 6.3 mW/cm^2 angibt. Allerdings umfaßt nach dieser Definition UVA einen Bereich von 315-400 nm; für die häufiger verwendete und auch hier zugrundegelegte Definition von UVA als Wellenlängen von 320-400 nm sind daher etwas geringere Intensitäten anzunehmen als oben angegeben. Vergleicht man dies mit der in dieser Arbeit gemessenen Intensität des UVASUN-Geräts bei einem Abstand von 40 cm, nämlich 58 mW/cm^2 , so ergibt sich eine etwa 10-fache UVA-Intensität im Vergleich zur Sonne.

Urbach (104) hat einige gebräuchliche Lichtquellen zur Lichttestung und Phototherapie miteinander verglichen; die wichtigsten von ihnen sollen aus dieser Arbeit als Überblick kurz angeführt werden:

Tabelle 1: Übersicht über einige gebräuchliche Lichtquellen

Lichtquelle	Emissionsspektrum	Filter	Erythemdosis erreicht nach:
Sonne	kontinuierlich, aber variabel	Athmo- sphäre, Ozon- schicht	20 min. (geo- graphische Breite 41°, Juni, mittags)
Fluoreszenz- röhre "Sun-Lamp" (Niederdruck- Quecksilber- bogenlampe)	kontinuierlich, max. bei 313 nm (UVB)	Kalzium, Zink, Thallium- Phosphat in spez. Glasum- hüllung	90-190 sec. (bei Abstand von 25.4 cm)
Fluoreszenz- röhre "Blacklight" (Niederdruck- Quecksilber- bogenlampe)	320 - 450 nm, max. bei 360 nm (UVA)	Barium- disili- kat, Phosphor- Glasum- hüllung	Ungeeignete Emission, sehr lange Expositions- zeiten
Sonnen- simulator (Hochdruck- Xenonbogen- lampe)	kontinuierlich (ähnlich dem Sonnenlicht)	Schott WG- Serien für: UVA, UVB	5-20 sec. bei Abstand von 25.4 cm

Fluoreszenzröhren ("Sun-Lamps" und "Blacklights") sind Bestandteil von Bestrahlungskabinen, z.B. zur PUVA-Therapie, oder von Solarien. Sonnensimulatoren werden wegen ihres sonnenähnlichen Spektrums hauptsächlich zu experimentellen Zwecken benutzt.

Was die Sonnenstrahlung betrifft, so bestehen ca. 92 % ihrer globalen (d.h. unter Einschluß der Streustrahlung des Himmels) ultravioletten Strahlung aus UVA; eine Sonnenhöhe von 90° , Meereshöhe, wolkenlose Bedingungen und ozonarme Atmosphäre vorausgesetzt. Dies entspricht etwa 5 % der totalen globalen Strahlung (alle emittierten Wellenlängen) (63). Da diese Idealbedingungen in der Regel jedoch nicht vorliegen, kann ein genaues UV-Spektrum der Sonne nicht präzise definiert werden (2).

Entsprechend variieren auch die Angaben über die Intensität von UVA: Nach der "Commission Internationale De L'Eclairage" beträgt diese bei einer Sonnenhöhe von 90° , wolkenlosen Bedingungen und einer Luftmasse von 1 6.3 mW/cm² (zitiert in: 62). Maurer (55) gibt bei gleichen Bedingungen, jedoch ohne Angabe der Luftmasse Werte von 5-6 mW/cm² an.

Ebenso existieren unterschiedliche Ansichten über die Dosis von UVA, welche den menschlichen Körper erreicht. Plewig und Hölzle (71) haben nach eigenen Beobachtungen festgestellt, daß in der Münchner Gegend an einem wolkenlosen Sommertag mehr als 100 J/cm² die Haut erreichen. Maurer (55) nimmt dagegen unter Berücksichtigung der verschiedenen Sonnenhöhen während des Tages eine theoretische maximale UVA-Dosis von ca. 100 J/cm² an, welche jedoch in Europa nie erreicht werde, weswegen man hier deshalb von einer UVA-Dosis von maximal 15-25 J/cm² pro Person und wolkenlosem Sommertag ausgehen müsse.

Kraemer (48,49) hat interessante Berechnungen zu derjenigen UVA-Dosis angestellt, welche einen einzelnen peripheren Leukozyten während einer therapeutischen UVA-Hautex-

position von 1 J/cm^2 erreicht. Unter der Annahme eines kutanen Blutvolumens von 500 ml/min , einer Strahlungsintensität von 1 mW/cm^2 und einer UVA-Transmission durch die Epidermis von 45% (nach 14) ergaben sich dabei Werte von $0.1 - 0.5 \text{ J/cm}^2$. Damit liegen diese ca. 100 mal niedriger, als die in der vorliegenden Arbeit erreichten Dosen.

1.2.3 Einflüsse der Umgebung

Temperatur:

In Höhe der Proben wurde eine Temperatur von $+ 40^\circ\text{C}$ gemessen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch die Wärmeempfindlichkeit der Leukozyten-Suspensionen in Analysenröhrchen getestet:

Mit Ausnahme von zwei Patienten mit Urtikaria (Wärme-Urtikaria und chronische Urtikaria) fand sich jedoch keine erhöhte Histaminfreisetzung nach Temperaturen von bis zu 43°C ; sodaß ein Hitze-Effekt durch die Bestrahlung unwahrscheinlich ist.

Fjellner und Hägermark (18) fanden im Wasserbad erst bei $+ 45^\circ\text{C}$ bei Mastzellen aus Ratten-Peritoneum eine signifikante Reduktion des Histamin-Release durch die Substanz 48/80. Kraemer et al. (48) hatten bei ihren Versuchen zur Lebensfähigkeit menschlicher Lymphozyten nach PUVA ähnliche Temperaturen in ihren Bestrahlungsgefäßen gemessen wie wir in dieser Untersuchung, nämlich $37 \pm 3^\circ\text{C}$. Ein Hitze-Effekt wird bei Experimenten mit UV-Bestrahlung nur selten angegeben; aus den wenigen zur Verfügung stehenden Daten geht aber hervor, daß Temperaturen selbst über 40°C keinen signifikanten Einfluß auf die untersuchten Reaktionen zu haben scheinen.

Umgebungsbeleuchtung und Einfluß auf verwendetes Medium:

In der vorliegenden Arbeit wurden die Leukozyten in einer farblosen, anorganischen Pufferlösung bestrahlt; die Konzentration betrug 2×10^6 Zellen/ml. Bis auf die Bestrahlung mit dem UVASUN-Gerät wurde entweder bei Tageslicht, oder bei Laborbeleuchtung gearbeitet: Letztere kommt aus Neonröhren, welche von einem Glasgehäuse umgeben sind. Mit dem CENTRA-UV-Meßgerät ließ sich selbst bei zusätzlichem Tageslicht keine UVA- oder UVB-Strahlung auf der Arbeitsfläche nachweisen.

Wang (106) hat den Einfluß von ungefärbten "daylight" Fluoreszenzlampen (Neonröhren) auf menschliche Zellen in Gewebekulturmedium untersucht und festgestellt, daß 90 % der Zellen im Kulturmedium dadurch abstarben, bei Suspension in einem Phosphatpuffer jedoch nicht. Die Strahlungsintensität an der Zelloberfläche betrug 4 W/m^2 . Wang gibt zu bedenken, daß die Lichtintensität, die auf die Arbeitsflächen in den meisten Labors trifft, ca. $1-2 \text{ W/m}^2$ beträgt und dadurch sehr wohl zytotoxische Dosen erreicht werden können. Daß dies nur in Kulturmedien auftritt und nicht in Pufferlösungen, wird durch die Bildung von toxischen Photoprodukten organischer Substanzen in den Kulturmedien erklärt. Wenn immer möglich, sollten daher Bestrahlungen von Zellen in Salz-Lösungen und nicht in Kulturmedien durchgeführt werden. Mit dieser Begründung führten auch Danpure und Tyrell (11) ihre Versuche zur O_2 - Abhängigkeit der Letalität von Zellen nach UVA-Bestrahlung in anorganischer Pufferlösung durch.

In der vorliegenden Untersuchung konnte trotz Bestrahlung in Pufferlösung und trotz fehlenden Nachweises von UV - Licht ein Effekt der Labor-Beleuchtung auf die Zellsuspensionen nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Kontroll-Suspensionen, also ohne Bestrahlung mit dem UVASUN- Gerät, wurden daher ebenfalls unter Tageslicht bzw. künstlicher

Beleuchtung gehalten, sodaß dieser Einfluß der Umgebung in den "Leerwert", bzw. besser den "Spontan"-Release mit einging.

1.2.4 Auswahl der Dosis:

In den vorliegenden Untersuchungen wurde mit UVA- Dosen von 10 J/cm^2 und 20 J/cm^2 bestrahlt. Dies liegt im Bereich von häufig verwendeten klinischen Parametern der Wirkung von UVA; nämlich der IPD (Immediate Pigment Darkening), welche bei dem hier verwendeten Gerät mit Dosen bis zu 10 J/cm^2 erreicht wird und der MED, welche für UVA, ebenfalls mit diesem Gerät, nach den Erfahrungen im Hause bei etwa 30 J/cm^2 nach 24 h liegt.

Die Bestrahlung mit höheren Dosen, wie sie etwa für eine dauerhafte Hautpigmentierung nötig sind, wurde versucht. Die Ergebnisse waren jedoch nicht verwertbar, da es sich zeigte, daß in den Makrotiterplatten die Flüssigkeit bei den entsprechend verlängerten Bestrahlungszeiten wohl unter dem Wärmeeinfluß verdunsteten. Dies ließ sich leicht objektivieren, da von den einpipettierten 0.7 ml Zellsuspension nach der Bestrahlung 0.55 ml für die Histaminbestimmung abpipettiert werden mußten. Bei Dosen bis zu 20 J/cm^2 blieben demnach immer noch einige μl Flüssigkeit mit den abzentrifugierten Zellen in den Vertiefungen der Makrotiterplatten zurück; bei höheren Dosen reichte die Flüssigkeit dagegen nicht aus.

. Im Folgenden wird nun, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, eine Übersicht verschiedener Arbeiten zur in vitro - Bestrahlung von Zellen mit UVA angegeben. Die Tabellen greifen nur Daten bezüglich der alleinigen Bestrahlung mit UVA heraus, auch wenn die Autoren zusätzlich mit anderen Wellenlängen-Bereichen und/ oder mit Zusätzen von Photosensibilisatoren gearbeitet haben.

Tabelle 2. IN VITRO-BESTRAHLUNG VON ZELLEN MIT PUVA

Bestrahlung von menschlichen Lymphozyten			
Autoren	Zellart	Methode	Strahlungsquelle und Spektrum
Scherer et al. 1977 (90)	menschl. periph. Lymphozyten	Hemmung der Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten durch PUVA; Nachweis durch verminderten ^3H -Thymidin-Einbau	UVA-Liegebox, Typ SIV, mit 70 Sylvania GTE Fluoreszenz-Blacklight-Lampen
Scherer et al. (91)	"	8-MOP-Einnahme oral; Blutentnahme vorher und nachher. Sonst wie oben.	"
Schmoeckel et al. 1978 (93)	"	Kulturen unstimulierter oder PHA-stimulierter Lymphozyten nach UVA-Bestrahlung, 8-MOP-Zugabe, oder PUVA wurden mikroskopisch untersucht.	"
Krüger et al. 1978 (94)	"	Hemmung der Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten durch PUVA; Nachweis durch ^3H -Thymidin-Einbau. Bestimmung der Zell-Lebensfähigkeit durch Anfärbung mit Trypanblau.	PUVA 4000-Gerät (Waldmann), mit Blacklight-Fluoreszenz-Lampen
Gasparro et al. 1984 (25)	"	Bestimmung eines Aktionsspektrums der Proliferationshemmung PHA-stimulierter Lymphozyten, mit oder ohne 8-MOP	450 W Xenonbrenner, 12 nm-Bandbreiten: 322,334, 346,358,370 nm Blacklight-UVA-Lampe (Westinghouse), max.346-358nm

Inten- sität mW/cm ²	Bestrah- lungs- zeit (min)	Dosis J/cm ²	Gefäße u. Zellzahl	Ergebnis
Output 4.5			5x10 ⁶ Zellen/ ml; davon 20 μ l (=10 ⁶ Zellen) in Mikrotiter- platten, bedeckt mit Parafilm.	UVA allein hatte keine Wirkung
"	30	8.1	"	Vor oraler Gabe von 8-MOP (also UVA alleine) keine Wirkung.
"	15,30	4, 8	2ml Zellsus- pension in 15 ml Test- röhrchen mit 8ml Kulturme- dium, bedeckt mit Parafilm	Keine morpholog. Veränderungen nach 8-MOP und UVA alleine; nach PUVA Zytolyse u. pyknotische Zellkerne.
"		0.1- 3.0	10 ⁶ Zellen/ml Kulturmedium; 150 μ l Ali- quots in Mi- krotiterplat- ten; Bestrah- lung ohne Deckel	UVA alleine: Dosen bis zu 3J/ cm ² ohne Einfluß auf Lymphozyten- proliferation. Keine Abtötung der Zellen nach Dosen bis 2J/cm ² .
		0.01- 6.0	4x 10 ⁶ Zellen/ ml in Phos- phatpuffer, in beschich- teten Röhr- chen, Transmis- sion > 300 nm	UVA alleine: Blacklight > 50J für 50% Prolifer- ationshemmung. Xenon: 322 nm bei 6J/cm ² ergab z.B. 99.5 % Hemmung

Tabelle 3. IN VITRO-BESTRAHLUNG VON ZELLEN MIT PUVA

Bestrahlung von Lymphozyten und Lymphoblasten			
Autoren	Zellart	Methode	Strahlungsquelle und Spektrum
Kraemer et al. 1979 (48)	periph. menschl. Lympho- zyten, EBV- Virus- trans- form. Lympho- blasten	Proliferations- hemmung unstimu- lierter Lympho- zyten und Lym- phoblasten durch PUVA; Nachweis des ^3H -Thymidin- Einbaus. Bestimmung der Zell-Lebensfähig- keit mit der Try- panblau-Methode.	4 parallel ange- ordnete UVA-Fluo- reszenzlampen FR40T12-PUVA, GTE Sylvania. Glasplattenfilter zur Elimination der Strahlung < 320 nm. Max. 355-365 nm
Kraemer 1982 (49)	"	Proliferations- hemmung unstimu- lierter Lymphozyten und Lymphoblasten durch PUVA; Nach- weis des ^3H -Thymi- din-Einbaus.	"

Inten- sität ² mW/cm ²	Bestrah- lungs- zeit (min)	Dosis J/cm ²	Gefäße und Zellzahl	Ergebnis
Für 11 cm Abstand berechnet: 2.25		0-3	75cm ³ Plastik- flaschen, ho- rizontal 2cm über der Glasplatte; diese liegt 8.5 cm über den Lichtröh- ren. 1×10^6 Zellen/ml farbloße Puf- ferlösung;	UVA alleine: 0.3J/cm ² bewirk- ten 77% Prolife- rationshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Kein Zelltod nach 2.9 J/cm ² bei Lym- phoblasten.
		0- 3.75	davon 25ml in den Flaschen. Glasplatte wird während Bestrahlung geschüttelt.	UVA alleine: Dosisabhängige Reduktion des ³ H- Thymidin-Einbaus.

Tabelle 4. IN VITRO-BESTRAHLUNG VON ZELLEN MIT UVA

Bestrahlung von menschlichen Lymphozyten

Autoren	Zellart	Methode	Strahlungsquelle und Spektrum
Cripps et al. 1978 (9)	menschl. B- und T-Lymphozyten	Bestimmung der Zell-Lebensfähigkeit nach UVA-, UVB-, UVC-Bestrahlung mittels Eosin-Farbstoff-Aufnahme.	Kabine mit 48 Fluoreszenzlampen, 320-400 nm, max. 360 nm. Für UVA wurden die Küvetten zusätzlich in einen Glasbehälter gestellt.
Morison et al. 1979 (57)	menschl. Lymphozyten und Monozyten	Bestimmung der Zell-Lebensfähigkeit nach UVA- und UVB-Bestrahlung mittels Trypanblau-Aufnahme	2.5 kW Xenonbrenner; Bestrahlung durch 10 cm einer zirkulierenden Aqua dest.-Lösung mit CuSO_4 und CoSO_4 . Für UVA Schott WG-354-Filter.
Morison et al. 1980 (58)	menschl. Lymphozyten	Hemmung der Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten durch UVA und UVB; Nachweis durch verminderten ^3H -Thymidin-Einbau. Bestimmung der Zell-Lebensfähigkeit mittels Trypanblau-Aufnahme.	"
Gast et al. 1985 (26)	"	Bestimmung der Vitalität der Lymphozyten durch Trypanblau-Aufnahme.	SUP-Strahler, 300-400 nm, mit Monochromator, Abstand 10 nm. (SUP= Selektierte Ultraviolett-Therapie; SUP-Strahlemittieren im UVA-UVB-Grenzbereich).

Inten- sität mW/cm ²	Bestrah- lungs- zeit (min)	Dosis J/cm ²	Gefäße und Zellzahl	Ergebnis
10.0	1-20	bis 9	3-5 x 10 ⁶ Zellen/ml Phosphatpuf- fer; Bestrah- lung in Quartz-Küvet- ten mit 1 cm Lichtöffnung.	Mit Dosen bis zu 9J/cm ² UVA kein vermehrtes Abster- ben der B- und T- Lymphozyten.
0.033- 24.3			2x10 ⁶ Zellen/ ml Hanks Puf- fer; 3 ml da- von in 3.5 cm Plastik- Petrischalen ohne Deckel.	Bei 2.7 J/cm ² UVA 50 % abgestorbene Zellen nach 72 h. Effektivität: UVC:UVB:UVA = 1:10 ⁻¹ :10 ⁻⁵
	72- 1312		"	50 % Reduktion des ³ H-Thymidin- Einbaus nach 520J/cm ² UVA; 50% Reduktion der Trypanblau- Extrusion nach 3.4 J/cm ² UVA.
		0.43	10 ⁶ Zellen/ml Kulturmedium; 0.5 ml davon in oben offe- ne und seit- lich abgedun- kelte Glas- röhrchen.	Bei 320-400 nm keine Verminde- rung der Zellvita- lität gegenüber unbestrahlten Kon- trollen; signifi- kanter Anstieg ab 310 nm.

Tabelle 5. IN VITRO-BESTRAHLUNG VON ZELLEN MIT UVA

Bestrahlung von Candida-Spezies

Autoren	Zellart	Methode	Strahlungsquelle und Spektrum
Daniels 1965 (10)	Candida albicans	Candida-Phototox- izitätstest zum Screening der phototox. Potenz verschiedener Stoffe.	15 W Blacklight- Fluoreszenzlampe, 2 Stück im Abstand von 7 cm. 320 - 390 nm.
Weinberg, Springer, 1981 (109)	Bäcker- hefe	Candida-Phototox- izitätstest zur Evaluierung pho- totox. Duftstoffe.	F15T8 BLB Sylva- nia Blacklights, 320-400 nm, max. 370 nm.
Kavli, Volden, 1984 (40)	Candida albicans	Candida-Phototox- izitätstest zum Screening der phototox. Potenz verschiedener Stoffe.	Fluoreszenzlampe (Philips-Black- light TL 20W/09) 320-400 nm.
Knudsen 1985 (46)	12 ver- schie- dene Candida- arten	Bestimmung der Sensitivität ver- schiedener Candi- da-Spezies auf PUVA.	Psoralight, Pharma Medica, mit Philips PL 20W/09 Blacklights.

Inten- sität mW/cm ²	Bestrah- lungs- zeit (min)	Dosis J/cm ²	Gefäße und Zellzahl	Ergebnis
	60 und mehr		Petrischalen, Candida-Rasen auf Kultur- medium. 22 cm Abstand von Lichtquelle	Hemmhöfe um die mit der phototox. Substanz getränk- ten Papierplätt- chen auf dem Candida-Rasen.
1.5 an d. Zell- ober- fläche	18x60	30	Platten mit 4 3.5cm Schalen mit Deckel verschlossen.	UVA alleine be- wirkt nur leichte Wachstumshemmung.
0.5	48x60	90	Petrischalen, Candida-Rasen auf Kultur- medium.	Hemmhöfe um die mit der phototox. Substanz getränk- ten Papierplätt- chen auf dem Candida-Rasen.
		2, 4, 8.	"	"

Tabelle 6. IN VITRO-BESTRAHLUNG VON ZELLEN MIT UVA

Bestrahlung von verschiedenen anderen Zellen			
Autoren	Zellart	Methode	Strahlungsquelle und Spektrum
Wang 1975 (106)	menschl. D98/AH - Zellen	Inkubation in Kulturmedium, Untersuchung der Kolonien-Bildung nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht.	Sichtbares Fluoreszenzlicht von 2 General Electric F1ST8/D-Daylight-Röhren, "weißes Licht", Spektrum: 310-750 nm.
Danpure, Tyrrell, 1975 (11)	Chines. Hamster- zellen und HeLa- Zellen	Untersuchung der O ₂ -Abhängigkeit der Letalität von Zellen nach UVA-Bestrahlung, unter aeroben u. anaeroben Bedingungen. Auszählen der Kolonien auf Kulturmedium.	3 Philips HPW 125W Blacklight-Lampen; nach Filterung 99% des Spektrums zwischen 365 u. 367 nm.
Fielitz et al. 1979 (16)	Maus- fibro- blasten, Hamster- zellen, menschl. Zellen.	Zelltod nach UVA-Bestrahlung; Inkubation in Kulturmedium, Auszählen der Kolonien.	UV-Licht von 290-420 nm, max. 365 nm Deckel schloß Strahlung < 300 nm aus.
Norlind, Wenner- sten, 1985 (64)	Meer- schwein- chen- Thymo- zyten	Hemmung der Proliferation der Zellen durch UVA und UVB; Nachweis durch vermindernden ³ H-Thymin-Einbau.	Black-Ray-A-Lampe Emission vorwiegend UVA, max. 365 nm.

Inten- sität mW/cm ²	Bestrah- lungs- zeit (min)	Dosis J/cm ²	Gefäße und Zellzahl	Ergebnis
0.4 an d.Zell- ober- fläche			60mm Schalen mit 3.5 ml Kulturmedium od. Phosphat- puffer, 250 Zellen/Schale.	90% abgestorbene Zellen in Kultur- medium; kein Effekt in Phos- phatpuffer.
		10-60	4x10 ⁶ Zellen/ ml anorgan. Puffer; je- weils 1.5 ml in 1cm zylin- drischen Glasgefäßen.	Unter O ₂ weit mehr abgestorbe- ne Zellen als unter N ₂ . Mit O ₂ bei 30J/cm ² ca 10% überlebende Zellen.
0.4 an d.Zell- ober- fläche	30-180	0.7- 4.2	120, 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ Zellen/ Petrischale	Nach 90 min UVA starben alle 3 Zellarten in Kulturmedium zum größten Teil ab..
bei 15 cm Abstand: 5.3 UVA 0.006 UVB		2, 4, 8, 16	5x10 ⁶ Zellen/ ml Phosphat- puffer in flachen Fal- con-Schälchen (Je 0.5 ml)	Bei 16 J/cm ² nur noch 66% der ³ H- Thymidin-Aufnahme der unbestrahlten Kontrollen

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, nahmen die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Dosen etwa eine Mittelstellung in dem aufgelisteten Dosis-Spektrum ein. Die einheitlichste Dosisverteilung fand sich in den Experimenten mit 8 - Methoxypsoralen und UVA (PUVA), da die Dosen hier den Verhältnissen in vivo während einer solchen Therapie angepaßt wurden (höchstens 8 J/cm^2 in vitro bei Schmoeckel et al. (94)). Sie lagen somit durchweg niedriger als in der vorliegenden Arbeit. Auch Untersuchungen über die zellulären Wirkungen von alleiniger UV-Bestrahlung verwendeten selten höhere UVA-Dosen als 20 J/cm^2 ; bei den Candida-Phototoxizitätstests sind offenbar auch höhere Werte üblich, hier von 30 J/cm^2 bzw. 90 J/cm^2 (41, 110).

In einigen der aufgeführten Arbeiten wurden keine Dosen angegeben; bei Fielitz (17) und Scherer et al. (92) konnten diese jedoch aus den Angaben über die Intensität der Lichtquelle und der Bestrahlungszeit nachträglich errechnet werden. Die Zellkonzentrationen in anorganischen Pufferlösungen oder Kulturmedien bewegten sich zwischen 10^6 und 5×10^6 Zellen/ml; nur Fielitz und Wang (17, 107) verwendeten niedrigere Zelldichten. Bei den Bestrahlungsgefäßen zeigten sich jedoch große Unterschiede; lediglich die Methodik von Morison et al. (58, 59) stimmt weitgehend mit der hier beschriebenen überein. Er bestrahlte ebenso 2×10^6 menschliche Lymphocyten pro ml anorganischer Pufferlösung in offenen Schalen von 3.5 cm Durchmesser. Allerdings waren letztere mit 3 ml Zellsuspension gefüllt, also etwa dem vierfachen der in dieser Arbeit verwendeten Menge von 0.7 ml.

Kraemer (49, 50) gehört ebenfalls zu den wenigen Autoren, die die Modalitäten der Bestrahlung reproduzierbar genau angegeben haben. Er bestrahlte 25 ml Lymphocyten und Lymphoblasten-Suspensionen (10^6 /ml anorganischer Pufferlösung) in 75 cm^3 -Plastikflaschen. Diese

lagen auf einer Glasplatte, welche gleichzeitig als UVA-Filter diente und geschüttelt werden konnte, sodaß die Zellen ständig in Suspensionen blieben. Ein Schüttler für die Makrotiterplatten stand in der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung, wäre aber von Vorteil gewesen, da die Zellen deutlich sichtbar auf den Boden der Bestrahlungsgefäße sanken und eine gleichmäßige Bestrahlung aller Zellen somit nicht sicher gewährleistet werden konnte. Besonders deutlich wurde dies in den Analysenröhrchen; möglicherweise erklärt sich auch daraus die wesentlich niedrigere Histaminfreisetzung in letzteren gegenüber den Makrotiterplatten.

1.3 Wirkungen von UVA auf Zellsuspensionen

Die Ergebnisse aus oben stehenden Tabellen beziehen sich in erster Linie auf den Lymphozyten-Transformationstest (LTT), bei dem eine Hemmung der Proliferation Mitogen- (z.B. Phythämagglutinin = PHA)- stimulierter Lymphocyten gemessen als verminderter ^3H -Thymidin-Einbau in die zelluläre DNA nachgewiesen wurde.

Häufig wurde zur Objektivierung der Lebensfähigkeit der Lymphocyten auch die Trypanblau-Färbung angewendet; lebensfähige Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuscheiden, während tote oder eingeschränkt lebensfähige Zellen sich anfärben.

Im LTT fanden Scherer et al. (90, 91) und Krüger et al. (50) keinen Effekt mit UVA-Dosen von bis 8 bzw. bis zu 3 J/cm^2 in UVA-Bestrahlungskabinen (Liegeboxen). Beide Geräte hatten einen Gesamt-output von 4.5 mW/cm^2 .

Schmoeckel et al. (93) konnte bei 8 J/cm^2 in einer eben- solchen UVA-Liegebox mikroskopisch keine morphologisch- en Veränderungen an den stimulierten Lymphocyten nach- weisen.

Gasparro et al. (27), Kraemer et al. (50, 51), sowie Norlind und Wennersten (64) verwendeten einzelne UVA-Fluoreszenzlampe. Kraemer et al. bestrahlten aus 11 cm Abstand mit einer dafür berechneten Intensität von 2.25 mW/cm^2 . Wellenlängen kleiner als 320 nm wurden durch einen Glasplattenfilter eliminiert. Im LTT ergab sich bereits bei einer Dosis von 0.3 J/cm^2 eine Proliferation von 77 % der Kontrollen. Norlind und Wennersten (64) bestrahlten Meerschweinchen-Thymocyten aus 15 cm Entfernung bei einer hierfür gemessenen Intensität von 5.3 mW/cm^2 UVA und 0.006 mW/cm^2 UVB. Zur Erzielung von 66 % des 3 H-Thymin-Einbaus der Kontrollen waren wesentlich höhere Dosen nötig, nämlich 16 J/cm^2 . Gasparro (27) benötigte für eine Proliferation von 50 % der Kontrollen sogar Dosen von über 50 J/cm^2 ; bei Verwendung von monochromatischem UVA eines Xenonbrenners mit Gittermonochromator genügten jedoch niedrigere Dosen, z.B. 6 J/cm^2 bei 322 nm für eine Proliferationshemmung von 99.5 %. Auch Morison (57, 58) verwendete den UVA-Anteil eines entsprechend gefilterten Xenonbrenners; es resultierten für eine Proliferationshemmung von 50 % jedoch extrem hohe Dosen von 520 J/cm^2 .

Bezüglich der Erfassung der Lebensfähigkeit menschlicher Lymphocyten mit der Trypanblau-Methode fanden Krüger et al. (50); Kraemer et al. (48, 49), Cripps et al. (9) und Gast et al. (26) bei niedrigen Dosen keinen Einfluß von UVA. Folgende Höchstdosen waren dabei verwendet worden: 2, 2.9, 9 und 0.43 J/cm^2 ; d.h. sie lagen sämtlich niedriger als die in dieser Arbeit verwendeten Dosen.

Morison (57, 58) bestrahlte dagegen mit gefiltertem UV-Licht eines Xenonbrenners und konnte damit schon bei 2.7 J/cm^2 UVA eine 50 % - Reduktion der Lebensfähigkeit der Lymphocyten mit der Trypanblau-Methode

nachweisen. Er fand hierbei eine Effektivität von $\text{UVC} : \text{UVB} : \text{UVA} = 1 : 10^{-1} : 10^{-5}$. In vitro-Bestrahlung von Bäckerhefe mit wesentlich höheren Dosen (UVA 30 J/cm) resultierte nur in leichter Wachstums-
hemmung (109).

Dampure und Tyrell (11) bestrahlten menschliche He La-Zellen mit dem gefilterten UVA-Anteil von Blacklight-Fluoreszenzlampen, versetzten die Zellsuspensionen jeweils mit Raumluft oder Stickstoff und konnten eine eindeutige Sauerstoffabhängigkeit des UVA-Effektes zeigen: Brachte man die bestrahlten Zellen auf Kulturmedien, so bildeten die aerob behandelten Zellen wesentlich weniger Kolonien als die mit Stickstoff versetzten Zellen; bei 30 J/cm² überlebten nur etwa 10 % der aerob bestrahlten Zellen. Versuche zur Erstellung von Aktionsspektren der Wirkungen von UVA zeigten, daß letztere Schäden an der DNA von Bakterien und Säugetierzellen hervorrufen kann (68), daß diese Schäden im Gegensatz zu den durch UVB erzeugten von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängen und daß die Aktionsspektren von UVA und UVB unterschiedliche Steigungen aufweisen, wobei der plötzliche Sprung der Steigungsänderung von Peak (68) bei 333 nm festgestellt wurde. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei den Aktionsspektren zur klinischen Wirkung von UVA : Schon Isolde Hausser, welche das erste klinische Aktionsspektrum für UVA erstellte, erwähnte die Sauerstoffabhängigkeit von Soforterythem und Sofortpigmentierung und vermutete, daß die Effekte von UVA und UVB auf verschiedenen chemischen Prozessen beruhten (zitiert in: 105). Neuere Untersuchungen zeigten, daß die Entstehung eines Erythems durch UVA durch Drosselung der Blutzufuhr zum bestrahlten Körperteil (Unterarm) teilweise verhindert werden kann, nicht aber die Entstehung eines Erythems durch UVB (24).

Alle diese Befunde weisen darauf hin, daß die Wirkungen von UVA und UVB auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Da die Aktionsspektren von UVB dem Absorptionsspektrum der DNA ähneln, wird die DNA als verantwortliches Chromophor der UVB-Wirkung angenommen (24), während man bei UVA eine indirekte Wirkung über reaktive Sauerstoffspezies, z.B. Radikalbildung, vermutet (68).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß UVA in vitro bestrahlte Zellen auf verschiedene Art und Weise beeinflusst: Einmal die Lymphozytenfunktion, hier dargestellt am Beispiel besonders des Lymphozyten-Transformations-Tests und der Trypan-Exklusions-Methode, wobei verschiedene Autoren eine Beeinträchtigung der Zellfunktion nachweisen konnten. Das Gelingen dieses Nachweises scheint von methodischen Gegebenheiten abzuhängen; so konnte in UVA-Bestrahlungskabinen in der Regel kein in vitro-Effekt gezeigt werden, während sich der UVA-Anteil von Xenonbrennern (höhere Intensität) als wirkungsvoller erwies. Zum anderen kann UVA ebenso wie UVB Schäden an der zellulären DNA hervorrufen, wenngleich dies offenbar auf verschiedenen Mechanismen beruht. Es handelt sich dabei um Pyrimidin-Dimere, Pyrimidin 6-4 Addukte, Einzelstrangbrüche und DNA-Proteinbindungen, deren biologische Bedeutung aber noch nicht geklärt ist (68).

1.4 Wirkung von UVA auf die Histaminfreisetzung:

Die Aktionsspektren verschiedener allergischer Reaktionen liegen im UVA-Bereich: Die Auslösung von photoallergischer Kontraktdermatitis (auch von phototoxischer Kontaktdermatitis) (6, 43, 44, 59,

61, 73, 98) und von Sonnenurtikaria (61, 71), welcher allerdings ein breiteres Aktionsspektrum bis in den UVB und UVC-Bereich zugeschrieben wird (70). Auch bei der polymorphen Lichtdermatose, einer Erkrankung mit jährlich im Frühsommer auftretenden juckenden Hauterscheinungen ungeklärter Ätiologie ("Sommerprurigo") und Ausbreitungstendenz (37), wird eine allergische Genese diskutiert (13, 70). Die Aktionsspektren dieser Erkrankung werden unterschiedlich angegeben: Intensives UVB (104) UVA (71), UVA + UVB (70); nach neuesten Untersuchungen von Ortel et al. (65) liegt das Aktionsspektrum vorwiegend im UVA-Bereich. Auch beim atopischen Ekzem wird in seltenen Fällen eine Provokation durch Sonnenlicht beobachtet (5).

Everett et al. (14) hatte die Penetration von UV-Licht durch die Epidermis gemessen und nachgewiesen, daß signifikante Mengen von UVA die Dermis erreichen. Damit werden Zellen des Blutes erreichbares Ziel, z.B. Lymphozyten oder die neben Mastzellen für allergische Reaktionen vom Soforttyp verantwortlichen basophilen Granulozyten. Als "äußerste Station des Immunsystems" (60) werden auch die epidermalen Langerhanszellen betroffen, welche wahrscheinlich in der Epidermis die Funktion der Antigenpräsentation übernehmen (103) und damit möglicherweise einen Einfluß auf die Entstehung der Kontaktallergie haben (59, 60). Von UVB ist bekannt, daß es in der Lage ist, die Ausprägung von allergischer Kontaktdermatitis zu vermindern, sowie die Überlebenszeit von Hauttransplantaten zu verlängern und die Funktion und Verteilung von Lymphozyten und Langerhanszellen zu verändern (59).

Was den Einfluß von UVA auf das Immunsystem betrifft, so existieren widersprüchliche Ergebnisse:

Nach neueren Untersuchungen von Morison (61) zeigte sich bei Mäusen sogar eine Förderung der Kontaktallergie, während jedoch die Abwehr gegen syngene UV-induzierte Hauttumoren durch Vorbestrahlung mit UVA geschwächt wurde.

Die Ergebnisse des vorigen Kapitels ergaben in einigen Fällen Einflüsse von UVA auf die Proliferation mitogenstimulierter Lymphozyten, sowie eine Hemmung der Fähigkeit dieser Zellen, Trypanblau auszuschleusen. Als morphologisches Korrelat für eine mögliche immunsuppressive Wirkung von UVA auf menschliche Haut fanden sich verminderte und geschädigte epidermale Langerhanszellen (27, 35, 61).

Die Auslösung verschiedener Photodermatosen allergischer Genese, sowie eine Beeinflussung von Zellen, welche an allergischen Spättypreaktionen beteiligt sind (Langerhanszellen, Lymphozyten), läßt auch bei UVA eine Interaktion mit dem Immunsystem vermuten.

Es gibt auch Hinweise für eine Wirkung von UVA auf die Histaminfreisetzung von Mastzellen in der Epidermis: Verschiedene Untersuchungen der Anwendung der Saugblasentechnik auf menschlicher Haut konnten nach UVA-Bestrahlung (in der Regel 2.5 x MED) in der gewonnenen serösen Flüssigkeit einen erhöhten Gehalt an Histamin und anderen Entzündungsmediatoren finden (27, 33).

Die Histaminfreisetzung trat vor einem UVA-induzierten Erythem auf, oder fiel zeitlich mit ihm zusammen, was zu der Vermutung führte, daß Histamin an der Entstehung eines UVA-induzierten Erythems beteiligt sein könnte. Übrigens ließ sich auch in Untersuchungen mit UVB-haltigen Lichtquellen ein erhöhter Gehalt an Histamin und anderen Mediatoren in der Haut nachweisen, möglicherweise ist dies ein Anhalt für eine Rolle dieser Mediatoren als Ursache der Sonnenbrandreaktion (28,31).

UVA kann auch allergische Reaktionen vom Soforttyp erzeugen: Bei Sonnenurtikaria fand sich nach UVA-induzierter Provokation ein erhöhter Histamingehalt des Blutes und elektronenmikroskopisch deutliche Mastzelldegranulationen im Gewebe (41).

Viele pruritische Dermatosen, bei denen zum Teil allergische Reaktionen vom Soforttyp oder anders ausgelöste Histaminfreisetzung eine Rolle spielen, z.B. atopisches Ekzem oder Urtikaria pigmentosa, bessern sich auf UV-Licht. Dies ist nicht nur nach UVB und PUVA der Fall (17, 30), sondern auch nach alleiniger UVA - Bestrahlung. Fjellner und Hägermark bestrahlten gesunde menschliche Haut nach intradermaler Injektion des Histaminliberators 48/80 und nach Injektion von Histamin selbst. Nicht nur nach UVB, sondern auch nach 15 J/cm^2 UVA verringerte sich die Histaminliberation durch 48/80, nicht aber die Reaktion auf Histamin. Daraus wurde geschlossen, daß UV-Licht eine Hemmung des Vorgangs der Mediatorfreisetzung aus den Mastzellen bewirkt. Werden jedoch Mastzellen aus Rattenperitoneum in vitro bestrahlt (18), so ließ sich dieser Effekt für UVA-Dosen bis zu $20 - 5 \text{ J/cm}^2$ nicht nachweisen; bei UVB zeigte sich dagegen eine dosisabhängige Hemmung der Histaminliberation durch 48/80. Im Gegensatz zu UVB zeigte sich bei UVA auch kein nennenswerter "Spontan"-Release, d.h. hier: keine Freisetzung ohne 48/80. Dieser "Spontan"-Release konnte durch metabolische Hemmstoffe der Histaminfreisetzung (Dinitrophenol) übrigens nicht gehemmt werden, die Histaminfreisetzung durch 48/80 dagegen schon. Dies wurde als Hinweis darauf gedeutet, daß in vitro UV-Licht per se (zumindest UVB) keinen sekretorischen Prozeß bewirkt, sondern eine Schädigung der Zellmembran.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkungsweise von UV-Licht auf Zellen in vitro untersucht: Leukozyten-suspensionen von hauptsächlich Normalpersonen wurden

mit 10 J/cm^2 und 20 J/cm^2 UVA bestrahlt und die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten fluorometrisch gemessen. Diese Methode hat sich in unserem Hause bereits bestens bewährt als "Photo-Basophilen-Histaminfreisetzungstest" (72,94) zum Screening für potentiell phototoxische Stoffe (z.B. Antibiotika oder nichtsteroidale Antirheumatika), wobei ebenfalls Leukozytensuspensionen mit UVA (bis 100 J/cm^2) bestrahlt wurden, jedoch nach Zugabe der zu testenden Substanzen.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden keinerlei chemische Stoffe zugesetzt:

Zusammenfassend ergab sich, daß sich zum Nachweis eines *in vitro*-Effektes von UVA auf die Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten Makrotiterplatten besser eigneten als Analysenröhrchen, weil sich bei ihrer Verwendung hochsignifikante Steigerungen der Freisetzung gegenüber den unbestrahlten Kontrollen ("Spontan"-Release) nachweisen ließen. Dies war der Fall trotz eines ebenfalls stark erhöhten "Spontan"-Release in den Makrotiterplatten (hochsignifikant im Vergleich zu den Analysenröhrchen): Subtrahierte man die Werte des "Spontan"-Release von denen nach Bestrahlung, so resultierten immer noch hochsignifikant höhere Freisetzungsraten in Makrotiterplatten bei 10 J/cm^2 und 20 J/cm^2 gegenüber den Werten in den Analysenröhrchen.

Die hier beschriebenen Beobachtungen beziehen sich in erster Linie auf Normalpersonen. Da bei der Bestrahlung mit UVA überwiegend mit Zellen von Normalpersonen gearbeitet worden war, resultierten bei den übrigen Kollektiven sehr kleine Patientenzahlen. Bei den Patienten mit allergischen Erkrankungen und mit Photodermatosen fanden sich im Vergleich zum Normalkollektiv nahezu identische Freisetzungsraten nach Bestrahlung. Es wäre daher interessant, ob sich bei Patienten mit atopischen Erkrankungen insbesondere solchen mit Ekzem, auch nach UVA-Bestrahlung eine ähnliche Mehrfreisetzung zeigen würde,

wie sie sich schon bei den meisten der übrigen Stimulationen andeutete. Hier müßte eine entsprechende Patientenauswahl stattfinden und dabei möglichst nach Atopikern ohne und mit Ekzem unterschieden werden. Gleiches gilt für Patienten mit Urtikaria, von denen in dieser Untersuchung nur sehr wenige teilgenommen hatten, dafür aber ein zum Teil stark abweichendes Mediator-Freisetzungsverhalten ihrer Leukozyten auffiel, welches nach den vorliegenden Einzelergebnissen noch nicht einheitlich beurteilt werden kann.

Bei den verschiedenen Patientengruppen ergaben sich meist keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Normalpersonen, doch sind wegen der geringen Fallzahlen hier keine endgültigen Schlüsse zu ziehen. Es fiel auf, daß in Analysenröhrchen die Freisetzungsraten besonders des "Spontan"-Release bei 7 Patienten mit allergischen Erkrankungen am höchsten waren (nicht signifikant) und daß eine Patientin mit Verdacht auf Urtikaria-Vaskulitis in Makrotiterplatten den deutlichsten Unterschied zwischen "Spontan"-Release und Bestrahlungswerten (20 J/cm^2) aufwies (Differenz 41.2 %). Die Patienten mit Photodermatosen zeigten jedoch keine auffälligen Änderungen der Histaminfreisetzung.

In einer früheren Arbeit hier im Labor waren bei 29 Atopikern und 10 Kontrollpersonen die basalen Histamin-Sekretionsraten in Analysenröhrchen bestimmt worden (34) und es fand sich auch hier ein etwas, aber nicht signifikant erhöhter "Spontan"-Release gegenüber den Kontrollpersonen.

Eine Dosisabhängigkeit des UVA-Effektes ließ sich in Analysenröhrchen nachweisen, allerdings bei sehr geringen Freisetzungsraten nach Abzug des "Spontan"-Release. In Makrotiterplatten war die Histaminfreisetzung nach 20 J/cm^2 sogar niedriger als nach 10 J/cm^2 , was darauf schließen läßt, daß nicht nur UVA, sondern auch

andere Einflüsse für die Histaminfreisetzung in Makrotiterplatten verantwortlich sind, erkennbar auch an dem stark erhöhten "Spontan"-Release. Offenbar stellten die lange Verweildauer (1 - 3 h) in einer kleinen Flüssigkeitsmenge (0.7 ml) bei einer großen Oberfläche (9.62 cm²) keine günstigen Bedingungen für die suspendierten Leukozyten dar.

Ein Kinetik-Versuch zeigte, daß der "Spontan"-Release sehr stark abhängig war von der Verweildauer der Zellen in den Makrotiterplatten: Schon nach 20 min. wurde bei 2 von 8 Patienten das Maximum erreicht; bei einem Patienten sogar nach 10 min. Nach 3 h waren bei den übrigen Probanden die Werte steil angestiegen; am höchsten interessanterweise bei 2 Atopikern.

Um weiteren Aufschluß über den Mechanismus der Histaminfreisetzung nach UVA-Bestrahlung zu gewinnen, wurde bei einigen Probanden zusätzlich die Freisetzung der β -Glucuronidase bestimmt, einer sauren Hydrolase, welche hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten aktiv in Lysosomen oder in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Gleichzeitig erfolgte ein Nachweis von LDH, um den zytotoxischen Anteil sowohl der Histamin-, als auch der β -Glucuronidasefreisetzung zu erfassen. Nach Bestrahlung mit UVA 10 J/cm² und 20 J/cm² fand sich keine signifikant erhöhte β -Glucuronidase-Extrusion gegenüber dem "Spontan"-Release; weder in Analysenröhrchen, noch - im Unterschied zum Histaminrelease - in Makrotiterplatten. In letzterem war der "Spontan"-Release von β -Glucuronidase ähnlich stark erhöht wie derjenige von Histamin, was darauf schließen läßt, daß ähnliche Mechanismen der Freisetzung vorlagen. Die Histaminfreisetzung konnte jedoch durch UVA - Bestrahlung in Makrotiterplatten noch signifikant gesteigert werden, die Extrusion von β -Glucuronidase dagegen nicht (eine leichte Steigerung konnte dagegen verzeichnet werden).

Betrachtet man die Signifikanzniveaus, so entspricht die LDH-Freisetzung nach UVA-Bestrahlung dem gleichen Muster wie die β -Glucuronidase-Freisetzung, d.h. keine signifikante Steigerung in Analysenröhrchen und Makrotiterplatten. Zwei Dinge fallen jedoch auf: Die wesentlich höheren Freisetzungsraten in % des Gesamtgehaltes bei LDH im Vergleich zu β -Glucuronidase und Histamin; außerdem die Tatsache, daß sich die LDH-Freisetzung nach Bestrahlung deutlich erhöhte, was aber wegen der geringen Fallzahlen nicht signifikant war. Es ergaben sich also folgende Freisetzungsmuster in Makrotiterplatten:

Tabelle 4: Freisetzungsmuster von Histamin, β -Glucuronidase und LDA in Makrotiterplatten nach UVA-Bestrahlung

	Histamin	β -Glucuronidase	LDH
n =	49 bzw 36	24	7
SR	34%	36%	54%
UVA 10J	45% (p=0.001)	41% (n.s.)	75% (n.s.)
UVA 20J	45% (p=0.001)	41% (n.s.)	63% (n.s.)

Bemerkung:

Alle Angaben verstehen sich als % des Gesamtgehalts (100 %-Werts) von Histamin, β -Glucuronidase und LDH. Die angegebenen Signifikanz-Niveaus nach Bestrahlung beziehen sich auf die Mehrfreisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release (SR). Die Freisetzung in Analysenröhrchen ergab keine auffälligen Unterschiede.

Dieses Freisetzungsmuster weist auf eine zytotoxische Ursache hin.

Somit scheinen basophile Granulozyten auf Bestrahlung empfindlicher zu reagieren als neutrophile Granulozyten. Daß dabei nicht nur die Aufbewahrung in Makrotiterplatten eine Rolle spielte, zeigt auch die deutlich erhöhte LDH-Freisetzung nach Bestrahlung gegenüber dem "Spontan"-Release.

Weshalb es in den Makrotiterplatten zu einem derart hohen "Spontan"-Release von Histamin, β -Glucuronidase, und LDH aus offensichtlich zytotoxischer Ursache kam, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. In Vorversuchen waren die Platten mit Tüchern abgedeckt worden, um jeglichen Lichteinfluß zu vermeiden, unterschiedliche Zeiträume zum Verschließen der Makrotiterplatten mit ihrem Deckel wurden gewählt; alle diese Faktoren erwiesen sich jedoch als nicht kritisch. Lediglich die Verweildauer der Zellsuspensionen in den Makrotiterplatten erwies sich, wie schon erwähnt, als von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Untersuchung konnte wegen zu geringer Fallzahlen bei der β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung keine Aufteilung der Probanden in verschiedene Erkrankungen vorgenommen werden. Bei früheren Experimenten hier im Labor (53), zeigten sich nach verschiedenen Stimulationen, auch physikalischer Art (mechanische und osmotische Stimulation), bei Atopikern mit schwerem Ekzem eine signifikant niedrigere β -Glucuronidasefreisetzung gegenüber Normalpersonen. An der β -Glucuronidase - Bestimmung in der vorliegenden Arbeit nahm nur eine Patientin mit atopischem Ekzem teil, (Nr. 14) welches zum Zeitpunkt der Blutabnahme manifest war. In Makrotiterplatten zeigte sie deutlich niedrigere Werte gegenüber dem Gesamtdurchschnitt, sowohl beim "Spontan"-Release, als auch Stimulation mit

UVA 10 J/cm² und 20 J/cm². In Analysenröhrchen fand sich dieselbe Tendenz, jedoch bei weitem nicht so deutlich. Weitere Untersuchungen wären nötig, um herauszufinden, ob Atopiker mit Ekzem auch nach UVA-Bestrahlung weniger β -Glucuronidase freisetzen, als Normalpersonen.

2. Wirkung von Anti-IgE und Ca -Ionophore auf die Histaminfreisetzung; Rolle des "Spontan"-Release

Anti-IgE verbindet sich mit den IgE-Immunglobulinen an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Durch eine hierbei stattfindende Brückenbildung ("bridging") zwischen den IgE-Immunglobulinen kommt es zu einer Mediatorfreisetzung (18, 85). Es handelt sich dabei um eine Histaminfreisetzung, die der durch spezifisches Allergen induzierten weitgehend entspricht, wobei vielfach nachgewiesen wurde, daß diese auf einer aktiven Zelleistung, nämlich einer Granula-Extrusion beruht (29, 52, 85, 87).

Ca -Ionophore bewirkt ebenfalls eine aktive Mediatorfreisetzung, welche aber unspezifisch und direkt zustandekommt, nämlich über einen erleichterten Transport von Kalzium- und Magnesium-Ionen in den Intrazellulärraum (21, 85). Foreman und Mongar (20) zeigten als erste die Sekretion aus Mastzellen nach Zugabe von Ca -Ionophore. Es ist bekannt, daß Kalzium für solche sekretorischen Prozesse nötig ist (21, 29, 67); in dieser Arbeit wurden die Zellen in TCM-Puffer suspendiert, welcher Kalzium und Magnesium enthielt. Lichtenstein et al.(52) konnten zeigen, daß die Histaminfreisetzung menschlicher Leukozyten durch Ca - Ionophore vollständig Kalzium-abhängig war, jedoch nur teilweise die Freisetzung durch Anti-IgE. Anwendung von Hemmstoffen der einzelnen Stadien der Histaminfreisetzung ergaben in den späteren Stadien eine Inhibition sowohl des Ca -Ionophore-induzierten, als auch des Anti - IgE - induzierten Release. Das mit cAMP assoziierte Frühstadium konnte jedoch nur bei der Antigen-induzierten Freisetzung mittels des Hemmstoffes Dibutyryl-cAMP inhibiert werden, was darauf schließen läßt, daß bis auf erwähntes Anfangsstadium Anti-IgE und Ca -Ionophore ähnliche Wirkungsme-

chanismen haben. Demnach wurde die Release-Reaktion eingeteilt in einen Antigen-abhängigen, Kalzium-unabhängigen ersten Schritt und einen Antigen-unabhängigen, Kalzium-abhängigen zweiten Schritt (52).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei insgesamt 105 Patienten eine Stimulation mit Anti - IgE 10^{-2} durchgeführt, bei 93 von diesen auch Stimulationen mit Kalzium Ionophore 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Dabei handelte es sich um Normalpersonen sowie um Atopiker, wobei die Patientenzahlen eine Unterscheidung in solche mit Ekzem und solche ohne Ekzem zuließen, und Patienten mit Urtikaria. Nach Stimulation mit Anti - IgE 10^{-2} fand sich bei allen Probanden- und Patientengruppen eine signifikante Steigerung der Histaminfreisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release. Für die einzelnen Erkrankungen ergaben sich durchschnittliche Freisetzungswerte von 22.7 % (der Gesamtfreisetzung) bis 34.6 %, dieser höchste Wert wurde von den Patienten mit atopischem Ekzem erreicht, während die Patienten mit nur respiratorischer Atopie nur wenig über der durchschnittlichen Freisetzung der Normalpersonen lagen (25.1 %). Dies entspricht früheren Untersuchungen im Labor von Dorothea von der Helm (34), wobei sich bei Atopikern nach Stimulation mit Anti-IgE ebenfalls eine höhere Histaminfreisetzung ergab, als bei Normalpersonen, vor allem in der 1. Minute des Release.

Bork und König (4) fanden mit einer Anti-IgE Konzentration von 10^{-3} bei 47 Atopikern jedoch höhere Durchschnittswerte, als in der vorliegenden Untersuchung. Sie arbeiteten mit der gleichen Methode und erreichten bei einer Anti-IgE Konzentration von 10^{-3} die höchsten Werte (40 %).

In einer früheren Arbeit im Labor von Ulrike Walz (107) wurden jedoch Maximalwerte bei einer Konzentration von Anti-IgE 10^{-2} erreicht, wobei, ebenso wie hier,

die höchste Freisetzung bei Patienten mit atopischem Ekzem gefunden wurde.

Ebenso ergab die Stimulation mit Ca - Ionophore bei fast allen Patientengruppen in allen drei Konzentrationen eine signifikante Steigerung gegenüber dem "Spontan"-Release, mit Ausnahme der Patienten mit atopischem Ekzem, bei denen der Unterschied trotz der höchsten Freisetzungsraten für Ca - Ionophore 10^{-4} und 10^{-5} nicht signifikant war. Dies erklärte sich durch einen deutlich erhöhten "Spontan"-Release, welcher sich auch schon bei Stimulation mit Anti-IgE gezeigt hatte. Ein Vergleich des "Spontan"-Release bei verschiedenen Erkrankungen ergab die höchsten Durchschnittswerte für Atopiker mit Ekzem (12.8 %), gefolgt von den Patienten mit Urtikaria mit 9.4 %, während sich die Werte der übrigen Erkrankungen (Atopiker ohne Ekzem, Photodermatosen) in der Nähe derer der Normalpersonen bewegten (7.6 %). Ulrike Walz hatte bei ihren Patienten mit atopischem Ekzem jedoch keine erhöhte basale Histaminsekretion feststellen können. Dorothea von der Helm berichtete dagegen über eine erhöhte spontane Histaminfreisetzung bei Atopikern gegenüber Kontrollpersonen, welche aber ebenso wie hier, statistisch nicht signifikant war. In ihrer Arbeit wurde nicht zwischen Atopikern mit und ohne Ekzem unterschieden; faßte man jedoch in der vorliegenden Untersuchung alle Atopiker zusammen, so ließ sich kein erhöhter "Spontan"-Release gegenüber den Normalpersonen nachweisen. Bork und König (4) untersuchten die Histaminfreisetzung von 47 Patienten mit allergischer Rhinitis oder Asthma bronchiale in derselben Weise wie hier und fanden einen durchschnittlichen Gesamtgehalt an Histamin von 23.0 ng/ml und einen "Spontan"-Release von durchschnittlich 1.6 ng / ml, was in Prozent des Gesamtgehalts ausgedrückt ca. 7 % ergibt.

Dies stimmt gut mit

den Werten für alle Atopiker ($n = 24$) in dieser Arbeit überein: Der durchschnittliche "Spontan"-Release betrug 7.6 %, identisch mit dem der Normalpersonen.

Vergleicht man die verschiedenen Patientengruppen bezüglich ihrer Anti - IgE- und Ca - Ionophore-induzierten Histaminfreisetzung nach Subtraktion des "Spontan"-Release, so zeigte sich bei den Atopikern mit Ekzem meist immer noch die höchste Freisetzung, aber weit weniger deutlich als zuvor. Auch bei den anderen Erkrankungen fand sich eine Steigerung der Histaminfreisetzung gegenüber dem Normalkollektiv, sowohl nach Anti-IgE als auch nach Ca - Ionophore - Stimulation; dies war aber nicht signifikant und verschwand auch völlig bei der niedrigsten Konzentration von Kalzium-Ionophore. Auch ein Vergleich der Kollektive der Atopiker mit und ohne Ekzem war bei keiner der genannten Stimulation signifikant.

In der Arbeit von Ulrike Walz (107) fanden sich abweichende Ergebnisse: Nach Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} zeigten die Atopiker mit Ekzem nahezu signifikant höhere Freisetzungsraten als die Normalpersonen. Nach Stimulation mit Kalzium-Ionophore 10^{-3} wurde von fast allen Patientenkollektiven (bis auf Urtikaria) sogar deutlich mehr Freisetzung als nach Anti - IgE beobachtet.

Es fiel auf, daß die Patienten mit Urtikaria ebenfalls einen relativ hohen "Spontan"-Release aufwiesen, eine hohe Freisetzungsrates nach Stimulation mit Anti-IgE, jedoch eine vergleichsweise niedrige Freisetzung nach Kalzium-Ionophore 10^{-3} . Bei der Konzentration von 10^{-4} erreichten diese Patienten dagegen knapp die höchsten Werte, bei 10^{-5} signifikant die höchsten Werte gegenüber dem Normalkollektiv. Somit konnten die Ergebnisse von Kern und Lichtenstein (42), die bei Patienten mit chro-

nischer Urtikaria eine verminderte "Releasability" nach Anti-IgE fanden, nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend kann man also feststellen, daß der erhöhte "Spontan"-Release wesentlich beitrug zu den erhöhten Freisetzungswerten der Patienten mit atopischem Ekzem. Die hohe Freisetzung der Patienten mit Urtikaria war jedoch auch dann nachzuweisen. Ansonsten ergab sich bei verschiedenen Patientengruppen kein signifikanter Unterschied der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE 10^{-2} und Ca - Ionophore 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

Dies stimmt mit den Beobachtungen von Lichtenstein (52) überein, der ebenfalls keine groben Unterschiede der Ca - Ionophore - induzierten Histaminfreisetzung bei verschiedenen Erkrankungen finden konnte. Auch Untersuchungen von Ring et al. (Ring, Allen, Mathison) zeigten bei Atopikern im Vergleich zu Normalpersonen nur gering erhöhte Freisetzungsraten nach Stimulation mit Ca - Ionophore (nicht signifikant).

Was die Stimulation mit Anti-IgE betrifft, so stellten Conroy et al. (7, 8) fest, daß zwar eine gute Korrelation zwischen Serum IgE und zellgebundenem IgE bestand (beide waren bei Atopikern erhöht), daß aber keine Korrelation zwischen der Menge von zellgebundenem IgE und der Stimulierbarkeit durch Anti - IgE zu erzielen war: Donatoren mit etwa derselben Menge von IgE pro Basophiler zeigten völlig unterschiedliche Freisetzungsraten auf Anti - IgE. Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte keine erhöhte Anti - IgE - induzierte Histaminfreisetzung bei Atopikern nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit den Serumwerten für Gesamt- IgE war jedoch nicht vorgenommen worden.

Conroy et al. (7) haben wegen ihrer Ergebnisse die diagnostische Wertigkeit des RAST (Bestimmung des

spezifischen IgE) in Frage gestellt. Bork und König (4) konnten keine eindeutige Korrelation zwischen RAST und Histaminfreisetzung bei ihren 47 Atopikern feststellen; ihrer Meinung nach sind dies ergänzende Testverfahren, wobei der Histamin-Release-Test Auskunft über die Reagibilität der basophilen Leukocyten gibt.

Die Ergebnisse von Conroy et al. und auch der vorliegenden Untersuchung weisen also daraufhin, daß die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulocyten nicht allein antigenabhängig ist, sondern auch von nicht immunologischen Parametern, umschrieben mit "Releasability", bzw. mit "Reagibilität". Eine erhöhte Releasability konnte in dieser Arbeit hauptsächlich bei Patienten mit atopischem Ekzem nachgewiesen werden, und zwar am deutlichsten beim "Spontan"-Release (nicht signifikant). Ring hat zur Pathogenese der Atopie das Konzept eines circulus vitiosus vorgeschlagen; wonach durch eine vermehrte IgE-Bildung, durch defekte Kontrollmechanismen (z.B. β -Blockade) und durch eine erhöhte Empfindlichkeit von Mastzellen und Basophilen eine Mediatorfreisetzung, z.B. von Histamin, bewirkt wird. Histamin greift wiederum in die Regulation bei der zellulären Immunreaktion ein und könnte für eine Hemmung der zellulären Abwehr bei Atopikern verantwortlich sein und auch für die geschwächte Suppressorzellfunktion. Da die Suppressorzellen die IgE-Bildung vermindern, erklärt sich die bei ihrer Suppression auftretende überschießende IgE-Produktion (76, 82, 84, 86).

3. Wirkung von physikalischen Stimuli auf die Histaminfreisetzung

Bei der Stimulation mit Wärme- und Kälteeinwirkung waren wegen zu geringer Probandenzahlen die Normalpersonen und die Patienten mit atopischen Erkrankungen zu einem Kollektiv zusammengefaßt worden, um sie mit zwei Patientinnen mit Urtikaria (chronische Urtikaria und Wärme-Urtikaria) zu vergleichen. Die beiden erstgenannten Kollektive unterschieden sich hinsichtlich ihrer Histaminfreisetzung auf erwähnte Stimuli relativ wenig; die Normalpersonen setzten selbst bei $+ 43^{\circ}\text{C}$ nur wenig mehr frei als bei Zimmertemperatur, die Atopiker lagen mit ihren Werten interessanterweise unter dem "Spontan"-Release (Zimmertemperatur), wobei letzterer leicht erhöht war. Faßte man beide Probandengruppen zusammen, so resultierte eine durchschnittliche Histaminfreisetzung von etwas über dem "Spontan"-Release bei Wärmestimulation (40°C und 43°C) und etwas unter dem "Spontan"-Release bei Kältestimulation ($+ 4^{\circ}\text{C}$).

Dagegen zeigten die beiden Patientinnen mit Urtikaria eine wesentlich höhere durchschnittliche Freisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release von 30,4 % (40°C) und 39,7 % (43°C). Bei einer dieser Patientinnen (chronische Urtikaria) wurde auch eine Kälte-Stimulation durchgeführt mit dem Resultat eines enorm hohen Release von 90%. Ihre Leukozyten setzten auch bei Wärmestimulation mehr Histamin frei als die der Patientin mit Wärme - Urtikaria, letztere war jedoch die einzige Versuchsperson, bei der sich eine dosisabhängige Wirkung der Wärmestimulation nachweisen ließ (15,8 % nach 40°C , 34,4 % nach 43°C). Im Gegensatz zu der Patientin mit Wärme - Urtikaria ließen sich aus den Krankenakten der Patientin mit chronischer Urtikaria

keinerlei Hinweise auf die hohe Freisetzung nach Kältestimulation eruieren. Leider gelang es nicht, diese Patientin zu einer entsprechenden Testung wieder einzubestellen.

Bei der UVA-Bestrahlung wurden Temperaturen von $+40^{\circ}\text{C}$ erreicht. Bei Stimulation im Wasserbad bei $+40^{\circ}\text{C}$ setzten Normalpersonen und Atopiker kaum mehr Histamin frei, als es dem "Spontan"-Release entsprach; bei $+43^{\circ}\text{C}$ war die Freisetzung sogar noch geringer. Es ist also unwahrscheinlich, daß eine Mehrfreisetzung nach UVA-Bestrahlung auf die Hitze einwirkung zurückzuführen ist. Die Folgen von Hitze einwirkung auf Zellen werden unterschiedlich angegeben: Malkinson (54) zitiert in vitro - Studien, wonach Zellen schon durch Temperaturen ab 41.5°C abgetötet wurden, mit einem steilen Abfall der Überlebensrate bei über 43°C . Zudem werden verschiedene therapeutische Nutzungen dieses Effekts beschrieben, wie die gleichzeitige Anwendung von Wärme zur Potenzierung einer Strahlen- oder Zytostatikatherapie, z.B. auch hypertherme Perfusion zur Behandlung von malignen Melanomen.

Fredholm und Hägermark dagegen, die die Einwirkung von Hitze auf die Histaminfreisetzung von Ratten-Mastzellen in vivo und in vitro untersuchten, fanden keinen solchen Effekt. Sogar Temperaturen von bis zu 52°C bewirkten keine höhere Freisetzung gegenüber einem "Spontan"-Release bei 37°C , erst bei 60°C wurden maximale Werte erreicht. Die hitzeinduzierte Freisetzung war im Gegensatz zur Freisetzung durch die Substanz 48/80 nicht durch metabolische Hemmstoffe des Vorgangs zu vermindern, daher wurde bei der Hitze einwirkung nicht auf ein aktives Geschehen, sondern auf einen unspezifischen Mechanismus geschlossen (22). Desgleichen konnten Fjellner und Hägermark bei Mastzellen aus Rattenperitoneum erst bei $+45^{\circ}\text{C}$ eine signifikante Hemmung des 48/80 induzierten

Histamin-Release finden (22).

Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit überein.

Bei der mechanischen Stimulation mittels Pasteurpipette und Vortex-Schüttler fanden sich bei Normalpersonen, Atopikern und Patienten mit Urtikaria keine wesentlichen Unterschiede; es ist aber erwähnenswert, daß die höchste Freisetzung nach maximaler Stimulation (30 x Suspendieren mit Pasteurpipette) von einer Patientin mit Urtikaria erreicht wurde mit 70.2 % nach Subtraktion des "Spontan"-Release. (Hierbei handelte es sich übrigens nicht um eine der Patientinnen mit den auffälligen Werten bei der Wärme-/Kälte-Stimulation). Es fiel auch auf, daß die Atopiker bei allen mechanischen Stimulationen geringfügig weniger freisetzen als die Normalpersonen. Dies war aber nicht signifikant. Bei sämtlichen Arten der Stimulation überstieg die Histaminfreisetzung deutlich den "Spontan"-Release und es ließ sich fast immer eine Art Dosisabhängigkeit feststellen:

30-maliges Suspendieren mit der Pasteurpipette zeigte einen größeren Effekt als 10-maliges, dieses wiederum mehr als Schütteln auf dem Vortex-Gerät. Die Unterschiede waren in fast allen Fällen signifikant.

Es fand sich also sowohl bei Wärme- und Kälteeinfluß, als auch bei mechanischer Stimulation der Zellen bei Atopikern eine Tendenz, etwas weniger Histamin freizusetzen als die Normalpersonen.

Joachim Lutz (53) hatte hier im Labor auch die β -Glucuronidase-Freisetzung von Normalpersonen und Atopikern (mit Ekzem) nach mechanischer Stimulation mittels 30-maliger Suspension mit einer Pasteurpipette getestet. In dieser Arbeit zeigte sich bei den Atopikern in Abhängigkeit der Schwere des Ekzems ebenfalls eine verringerte Freisetzung gegenüber der Kontrollgruppe; bei den Atopikern mit schwerem Ekzem war dies gerade signi-

fikant. In der vorliegenden Arbeit konnte wegen zu geringer Fallzahlen statistisch nicht zwischen Atopikern ohne und mit Ekzem unterschieden werden. Unter den hier getesteten 11 Atopikern wiesen 3 ein Ekzem auf; ihre durchschnittliche Histaminfreisetzung bei 30 x suspendieren mittels Pasteurpipette lag aber deutlich über der der Normalpersonen (Atopiker mit Ekzem: 50 %; Normalpersonen: 41 % nach Subtraktion des "Spontan"-Release).

Bei der osmotischen Stimulation wurde das Medium TCM-Puffer abzentrifugiert und durch das zu testende osmotisch wirksame Medium ersetzt. Diese Methode ergab deutlich bessere Histaminfreisetzungswerte als Zugabe von nur 100 μ l osmotisch wirksamer Substanz zur Ausgangs-Zellsuspension in TCM-Puffer (0.5 ml): Bei der höchsten Konzentration von Mannit (10 %) ließ sich so nur eine Freisetzung von knapp über dem "Spontan"-Release erreichen.

Setzte man die Zellen dem Medium NaCl 0.9 % aus, so fiel allgemein, aber besonders deutlich bei zwei Patienten mit Urtikaria eine niedrigere Histaminfreisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release in TCM-Puffer auf, obwohl dieser ebenfalls isoton ist. TCM-Puffer enthält allerdings Kalzium, welches ja für zelluläre Sekretionsprozesse benötigt wird und daher für den erhöhten Release verantwortlich sein könnte.

Lediglich die Patienten mit atopischen Erkrankungen zeigten eine gleich hohe Freisetzung in NaCl 0.9 % und TCM-Puffer; der Wert für NaCl 0.9 % lag signifikant über dem der Normalpersonen. Nach Stimulation mit NaCl 4.1 % ergaben sich bei Atopikern und Normalpersonen signifikant erhöhte Werte gegenüber dem "Spontan"-Release in TCM-Puffer, wobei wiederum die Atopiker die höchsten Durchschnittswerte erreichten (20.5 %), allerdings nicht signifikant erhöht im Vergleich zum Normalkollektiv.

Kinetikversuche mit unterschiedlicher Verweildauer in hypotoner Lösung (Aqua dest.) ergaben maximale Freisetzungsraten bei allen Krankheitsgruppen meist schon nach 10 min, wobei die höchsten Werte überhaupt von zwei Atopikern (mit und ohne Ekzem) erreicht wurden (nahe 100 %). Im Gegensatz zur Wärme-/Kälte-Stimulation und zur mechanischen Stimulation scheinen Atopiker auf osmotische Reize in vitro empfindlicher zu reagieren als Normalpersonen.

Brachte man die Zellen in verschiedene Konzentrationen einer Mannit - Lösung, so zeigte sich ein Maximum der Freisetzung erst bei der höchsten Konzentration, nämlich 10 %. Auch hier wurden die zwei höchsten Werte von Atopikern erzielt, allerdings auch die zwei niedrigsten (Es handelte sich um respiratorische Atopie; ohne Ekzem). Es fiel auf, daß bei den niedrigeren Konzentrationen (1 % und 5 %) die Freisetzungsraten meist unter dem "Spontan"-Release in TCM-Puffer lagen. Dies ist allerdings nicht durch fehlendes Kalzium zu erklären, denn als Lösungsmittel diente TCM-Puffer. Denkbar wäre eine Interferenz zwischen dem Zuckeralkohol und sekretionsfördernden Ionen wie Kalzium und Magnesium im Puffer. Bei höheren Mannitkonzentrationen (ab 7.5 %) kam dann offensichtlich die Hyperosmolarität zum Tragen und Zellyse trat ein.

Für die Osmolaritäten der Lösungen errechneten sich bei der höchsten Konzentration von Mannit in TCM - Puffer 850 mosm/l und bei NaCl 4.1 % 1324 mosm/l. Während sich für NaCl 4.1 % bei allen kollektiven eher niedrige (bis zu 20 %) Freisetzungsraten mit vergleichsweise niedriger interindividueller Schwankungsbreite ergaben (bis zu $\pm S = 15$ %), zeigten sich bei Mannit 10 % trotz der geringeren Osmolarität weit höhere Werte (bis zu 60 %) bei großer Schwankungsbreite. Dies läßt den Schluß zu, daß die Mediatorfreisetzung durch osmotische Reize

nicht allein von der Osmolarität abhängt, sondern auch von der Art der wirksamen Substanz.

Die Testung hyperosmolaritätsbedingter Histaminfreisetzung kann in vivo praktische Bedeutung erlangen, z.B. für die Verträglichkeit von Röntgenkontrastmitteln, welche ebenfalls teilweise hyperosmolar sind und eine deutliche Mediatorfreisetzung bewirken können (75, 77), die jedoch nicht durch Hyperosmolarität alleine erklärt werden konnte.

Ring und Arroyave (77) haben deshalb parallel zu Röntgenkontrastmitteln auch die in-vitro-Freisetzung durch hyperosmolare NaCl-Lösungen und durch bis zu 30 %ige Dextrose-Lösungen getestet. Dabei wurden 100 μ l osmotisch wirksamer Substanz zu 0.4 ml Zellsuspension gegeben, während bei vorliegender Untersuchung das Medium der Zellsuspension (TCM - Puffer) durch das osmotisch wirksame Medium völlig ersetzt wurde. Daher konnten Ring und Arroyave mit ihren wesentlich geringeren Mengen osmotisch wirksamer Substanz eine nennenswerte Histaminfreisetzung erst bei höheren Konzentrationen erzielen: Bei NaCl erst bei 8.2 %; bei Dextrose erst bei 30 %).

Mit dem Röntgenkontrastmittel Iothalamat konnten Ring und O'Connor (78) nachweisen, daß Atopiker eine signifikant höhere Histaminfreisetzung zeigten, als Normalpersonen. Die Stimulation mit hyperosmolaren Lösungen in der vorliegenden Arbeit ergab ebenfalls eine Tendenz der Atopiker, etwas mehr Histamin freizusetzen als die Normalpersonen; was jedoch nicht signifikant war. Reite (74) hat bei seinen Versuchen zur Histaminfreisetzung aus Schildkrötenblut nach osmotischer Stimulation mit NaCl 0-1.8 % ähnliche Versuchsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit geschaffen: Auf 1 ml Blut kamen 10 ml Kochsalzlösung. NaCl 1.8 % bewirkte keine signifikante Steigerung der Histaminfreisetzung; jedoch sind

diese Ergebnisse nicht mit obengenannten vergleichbar, da die basophilen Leukozyten von Schildkröten nach Meinung der Autoren wesentlich resistenter sind, als Säugetierzellen (Rattenmastzellen).

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Histaminfreisetzung menschlicher basophiler Granulozyten nach physikalischer Stimulation (Wärme- bzw. Kälteanwendung mittels Wasserband und Kühlschrank, mechanische Traumatisierung mittels Pasteurpipette und Vortex-Schüttler, osmotische Stimulation in NaCl, in Aqua dest. und Mannit), nach Bestrahlung mit UVA, sowie nach Stimulation mit Anti-IgE und Ca²⁺-Ionophore untersucht.

Es konnte nachgewiesen werden, daß nach allen genannten Reizeinwirkungen eine signifikante Steigerung der Histaminfreisetzung gegenüber dem "Spontan"-Release erreicht wurde. Dabei ergab der Vergleich von einzelnen Patientengruppen wenig signifikante Unterschiede gegenüber dem Normalkollektiv. Es fiel auf, daß Patienten mit atopischen Erkrankungen, insbesondere solche mit atopischem Ekzem, in den meisten Fällen die höchste durchschnittliche Freisetzungsrates aufwiesen. Am deutlichsten wurde das bereits am "Spontan"-Release (ca 13 %), d.h. ohne jegliche Stimulation, aber auch nach Subtraktion desselben bei der überwiegenden Zahl der Stimulationsexperimente: Nach Stimulation mit Ca²⁺-Ionophore 10^{-3} und Anti-IgE 10^{-2} , sowie nach Anwendung osmotischer Reize setzten die Zellen von Patienten mit atopischen Erkrankungen am meisten Histamin frei. Bei der mechanischen Stimulation mittels der Pasteurpipette konnte eine deutliche Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Durch Anwendung von Wärme oder Kälte konnte in keinem Fall, ausgenommen bei zwei Patienten mit Urtikaria, (einmal lokalisierte Wärme-Urtikaria) eine deutliche Steigerung der Histaminfreisetzung im Vergleich zum "Spontan"-Release bei Zimmertemperatur erreicht werden.

Bei Bestrahlung mit UVA 10 J und 20 J/cm² wurde in methodischen Voruntersuchungen deutlich, daß die Höhe der erreichten Mediatorfreisetzung in entscheidendem Maße von der Größe der bestrahlten Oberfläche der Zellsuspension abhängt: Im Gegensatz zu Analysenröhrchen (0.8 cm² Oberfläche) ließen sich in Makrotiterplatten (9.6 cm²) hochsignifikante Steigerungen der Histaminfreisetzung (ca 45 %) gegenüber dem "Spontan"-Release feststellen, obwohl letzterer mit ca 34 % ebenfalls deutlich erhöht war im Vergleich zu ca 4 % in Analysenröhrchen.

Ähnliches galt für die Freisetzung von β -Glucuronidase aus neutrophilen Granulozyten. Nach Analyse der LDH-Konzentration im Überstand ergaben sich Hinweise für einen zytotoxischen Freisetzungsmechanismus in den Makrotiterplatten, sowohl beim "Spontan"-Release, als auch nach Stimulation mit UVA. Eine Ursache für den erhöhten "Spontan"-Release in Makrotiterplatten konnte nicht gefunden werden; es zeigte sich jedoch eine starke Abhängigkeit von der Verweildauer der Zellsuspension in diesen Gefäßen. Nach UVA-Bestrahlung mit 10 und 20 J/cm² ließ sich in den Makrotiterplatten keine Dosisabhängigkeit nachweisen. In vorläufigen Untersuchungen mit kleinen Patientenzahlen fanden sich keine Unterschiede der UVA-induzierten Histamin-Freisetzung bei Patienten mit Lichtdermatosen. In der vorliegenden Arbeit wurden die methodischen Voraussetzungen geschaffen, diese Fragestellungen gezielt an ausgewählten Patientenkollektiven zu untersuchen.

DATENANHANG

Abkürzungsverzeichnis

SR	= "Spontan"-Release
100%	= Gesamtfreisetzbare Menge von Histamin, β -Glucuronidase oder LDH
a-IgE	= Anti-Ig E der Konzentration 10^{-2}
P30	= 30 malige Anwendung der Pasteurpipette
P10	= 10 malige Anwendung der Pasteurpipette
Vo	= Vortex-Genie Schüttler, 1 min bei Stärke 10
Rö	= Analysenröhrchen
P1	= Makrotiterplatten
10 J	= UVA 10 J/cm ²
20 J	= UVA 20 J/cm ²
His	= Histamin-Bestimmung (wenn nicht anders angegeben, handelt es sich immer um Werte der Histamin-Bestimmung)
β -Gl	= β -Glucuronidase-Bestimmung
LDH	= LDH-Bestimmung
Pat	= Patienten

Bem: Alle Werte sind in % des 100%-Werts angegeben.
 Als 100%-Wert gelten die absoluten Freisetzungsmengen in:
 - ng/ml für die Histaminbestimmung
 - Extinktionswerte für β -Glucuronidase- und LDH-Bestimmung

Bem: Bei den Abkürzungen der Patienten-Namen bezeichnet der erste Buchstabe den Nachnamen, der zweite Buchstabe den Vornamen.

m	= männlich
w	= weiblich
J	= Alter in Jahren
A	= Patienten mit atopischen Erkrankungen
AE	= Patienten mit atopischem Ekzem
U	= Patienten mit Urtikaria
Ph	= Patienten mit Photodermatosen
Bi/We	= Patienten mit Allergie gegen Bienen- und Wespengift
I	= Patient mit ungeklärter Allergie gegen Insektengift

Bei allen nicht gekennzeichneten Probanden handelt es sich um Normalpersonen

Zur Numerierung: Die Nummern, die bei den Abkürzungen für die einzelnen Erkrankungen angegeben sind, entsprechen denen in Kapitel 1.2 (Klinische Daten), sodaß für jeden Patienten die dort angeführten genaueren Befunde zugeordnet werden können.

Pat.	SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ -Ionophore 10-3 10-4 10-5	P30	Vo	0,9% NaCl 4,1%	+4°C	40°C	43°C	Alter und Geschlecht	
BS	6.9	23.2	25.3	56.3	5.7	3.5	41.4	15.5	2.3	1.1	4.6	m. 17 J
LH	2.6	29.6	11.1	39.3	6.0	3.4	43.6	13.7	1.7	4.3	3.4	w. 25 J
GK	17.2	25.3	49.5	90.5	19.1	17.2	76.2	67.6	23.8	56.2	5.7	m. 20 J
LO	14.6	11.6	41.7	77.1	18.8	20.8	54.2	72.9		16.7	12.5	m. 22 J
KM	2.2	31.9	7.2	85.1	2.2	3.6	43.2	15.1	9.8	25.2	0.7	m. 17 J
ZO	2.5	9.6	45.0	2.5	22.5	45.0	2.5	15.0		90.0	45.0	w. 36 J
RM	1.1	22.8	3.3	37.8	5.6	4.4	46.7	28.5	2.2	20.0	17.8	w. 62 J
EU	3,4	15.0	49.6	61.5	8.5	4.3	51.3	18.8				w. 47 J
RH	3.7	36.6	3.3	25.3	3.7	2.3	35.3	8.0				m. 33 J
AM	6.8	20.8	8.6	53.1	8.6	9.2	61.1	12.3				m. 18 J

AE
Nr. 2

A
Nr. 6

U
Nr. 36

A
Nr. 24

Pat.	SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ 10 ⁻³	-Ionophore 10 ⁻⁴	p30	p10	Vo	NaCl 0,9%	1	Mannit in % 5	7.5	10	100μ 10	Alter und Geschlecht
RM	6.7	19.6	3.8	71.5	21.8	7.9	52.1	32.1	34.9	3.6	22.4	1.2	1.8	60.6	6.7 m. 36 J.
VG	7.5	26.8	22.2	51.6	8.4	8.9	43.5	30.2	18.7	2.7	17.3	2.2	2.7	39.6	12.0 m. 22 J.
RM	7.4	12.4	56.5	63.0	26.0	14.8	49.6	26.0	15.7						w. 43 J.
SM	5.8	20.3	51.9	43.6	7.7	7.7	45.5	37.2	17.3	2.6	13.2	1.9	2.6	4.2	11.6 w. 42 J.
BJ	5.4	14.8	29.7	48.7	7.2	9.9	32.4	23.5	13.5	3.6	23.9	1.8	1.8	2.7	3.6 w. 43 J.
AA	5.4	33.5	30.2	48.8	15.5	12.8	38.8	23.6	23.3	2.3	8.4				m. 36 J.
FJ	4.1	42.3	40.0	61.2	18.6	9.4	46.1	28.2	47.6						m. 47 J.
PS	3.2	32.8	17.3	73.5	10.8	3.2	37.8	30.4							w. 24 J.
LA	3.6	25.6	5.6	38.6	4.6	4.1	28.4	24.9	24.1	2.5	22.8	4.1	3.1	7.6	35.5 m. 22 J.
SS	7.7	41.9	21.1	58.7	13.5	7.9	43.1	39.4	30.1	6.7	11.9	5.2	5.8	13.5	32.1 m. 28 J.
WC	4.5	46.3	16.0	66.1	10.9	6.4	40.3	24.0	6.4	2.7	8.0	3.5	8.3	34.5	61.3 w. 29 J.
WM	6.7	38.9	33.7	78.9	10.4	6.7	41.9	47.1	65.5	3.1	30.7		4.3	11.0	36.1 w. 31 J.

All. RE
Nr. 46
A
Nr. 20

Pat.	SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ 10 ⁻³	-Ionophore 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Alter Geschlecht	
BH	7.3	16.9	21.1	33.4	16.7	6.5	m. 38 J.	
SH	8.2	22.8	35.1	64.3	49.1	8.3	m. 23 J.	A Nr. 15
PA	8.7	22.9	9.3	58.1	36.2	11.0	w. 62 J.	
AM	28.1	16.9	28.1	56.3	31.1	17.4	w. 30 J.	
HM	29.1	23.9	49.2	74.9	74.6	47.6	w. 44 J.	AE Nr. 17
LC	6.3	18.0	39.3	66.0	18.2	7.7	w. 41 J.	Bi/We Nr. 27
WJ	3.7	39.6	24.0	59.8	8.4	6.2	w. 30 J.	A Nr. 13
MM	5.8	8.6	2.9	78.2	17.4	14.5	w. 42 J.	A Nr. 8
KJ	5.6	27.0	35.7	53.7	18.1	8.8	m. 40 J.	
PA	13.7	39.0	21.3	53.7	35.0	15.3	w. 49 J.	U Nr. 35
ZM	7.4	22.7	55.4	49.1	31.6	20.6	m. 19 J.	Bi/We Nr. 26
FJ	10.3	37.3	52.9	44.7	23.7	14.1	m. 70 J.	U Nr. 31
CP	15.9	7.9	22.2	30.2	22.2	20.7	m. 25 J.	U Nr. 29
GR	8.2	47.6	12.3	54.4	22.2	12.3	w. 54 J.	U Nr. 32
VO	11.9	27.0	45.1	48.5	26.4	22.6	m. 60 J.	
MP	4.3	24.2	30.7	61.4	12.7	11.1	m. 13 J.	A Nr. 9
KW	2.2	23.3	34.4	58.1	24.2	5.4	m. 20 J.	A Nr. 7

Histamin-Bestimmung

8-Glucuronidase-Bestimmung

Pat.	Rö SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ -ionophore 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	Rö 10J	Rö 20J	PL SR	PL 10 J	PL 20 J	Rö SR	100%	Rö 10 J	Rö 20 J	PL SR	PL 10 J	PL 20 J	Alter und Geschlecht
SJ	1	24.4	28.3	55.6	5.0	1.5	0	24.2	20.1	27.2	8.3	0.92	8.8	9.2	42.5	17.4	15.9 m. 41 J
GJ	35.9	41.8	45.3	75.5	43.3	40.9		45.6	55.2	46.0	4.7	0.92	4.11	4.0	32.4	19.2	18.0 w. 24 J
SL	5.9	21.5	20.8	55.3	10.7	6.6	3.0	64.8	93.3	98.2	6.9	0.60	5.0	5.2	41.6	69.3	78.4 w. 58 J
SH	2.0	13.4	36.3	50.5	5.1	3.1	0	88.6	74.4	37.7	3.9	0.61	3.9	4.4	76.9	64.9	38.2 m. 17 J
WB	10.3	17.6	35.7	51.4	18.5	19.8	8.2	6.1			5.0	1.20	4.3	5.0	21.8	23.3	50.9 w. 46 J
MP	7.4	39.1	10.4	63.3	4.0	5.4	10.8	8.1	57.9	59.5	5.5	8.85	5.2	5.7	37.7	64.0	73.1 w. 25 J
RJ	11.6	47.3	29.1	69.3	7.4	14.5	9.0	12.4	67.8	72.4	7.8	0.98	7.1	7.2	52.7	59.2	61.2 w. 60 J
K	7.1	23.1	20.5	52.4	7.1	22.2	11.9	6.5	38.2	48.7	52.5	5.9	0.80	4.9	5.7	78.4	34.7 w. 48 J
DR	4.2	8.7	5.5	62.5	6.9	6.9	5.5	25.0	35.8	48.7	66.7	3.6	1.41	3.3	17.3	20.4	41.4 w. 84 J
HJ	3.3	7.0	10.0	96.6	15.0	8.3	3.3	35.1	52.6	54.6	8.7	0.69	6.7	5.2	22.6	16.9	17.1 w. 28 J
SC	8.4	27.8	51.1	77.8	24.3	10.0	3.8	40.2	53.8	48.0	4.7	1.02	3.0	3.2	11.5	20.7	15.6 w. 22 J
SF	2.1	20.9	26.0	88.8	7.4	8.2	2.1	21.2	30.5	33.0	4.6	1.11	3.3	3.3	15.0	20.5	15.0 m. 36 J

Ph
Nr. 38
AE
Nr. 14

Histamin-Bestimmung

β -Glucuronidase-Bestimmung

Pat.	Rö SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ -ionophore 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	Rö 10J	Rö 20J	PL SR	PL 10 J	PL 20 J	Rö SR	100%	Rö 10 J	Rö 20 J	PL SR	PL 10 J	PL 20 J	Alter und Geschlecht
FB	1.8	13.2	1.8	44.2	1.8	1.8	1.8	26.4	25.7	34.8							w. 22 J
HJ	5.1	15.1	3.4	61.4	9.2	5.9	3.4	6.7	19.7	27.5							m. 22 J
GM	4.6	13.5	3.7	65.8	9.3	3.7	5.6	3.7	31.5	42.3							w. 17 J
WJ	1.1	23.5	9.6	66.5	10.6	2.7	2.1	2.1	32.5	43.0							w. 65 J
ML	29.9	10.8	12.3	53.3	8.9	4.4	3.3	3.3	29.9	40.2							m. 43 J
SA	4.2	28.9	5.1	21.5	3.4	3.4	2.9	3.4	56.3	85.9	44.5						m. 81 J
NA	13.7	41.9	44.3	74.3	19.5	13.6		21.4	27.3	39.7	1.08			10.7	12.7	34.4	m. 43 J
																	Ph Nr. 41
																	Ph Nr. 42

RP	4.7	10.7	28.3	67.1	5.9	8.2	4.7				6.8	0.87	7.4				w. 21 J	U
KJ	7.4	47.8	7.7	62.3	9.7	9.7	8.0				4.8	1.23	7.2				w. 18 J	Nr. 33
BE	5.5	43.6	7.6	25.1	7.7	5.8	5.5				6.6	1.01	7.5				m. 76 J	
SW	3.3	8.0	32.7	72.1	9.9	6.5		13.2	28.3	32.1							m. 28 J	
BM	4.7	13.1	37.7	59.4	7.5	5.7		25.1	49.3	29.5	0.91			10.8	40.7	12.9	w. 58 J	
WE	3.4	38.3	17.0	71.9	2.6	3.3		23.7	20.3	23.4							w. 21 J	AE, Ph Nr. 23

Pat.	R ₀ SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ -ionophore 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵			R ₀ 10J	R ₀ 20J	PL SR	PL 10 J	PL 20 J	Alter und Geschlecht
RT	8.1	40.6	24.0	45.3	10.5	11.1			35.5	37.2		m. 25 J
RS	8.9	21.7	23.3	42.2	8.9	11.1			32.5	33.2		m. 36 J
GR	8.1	32.5	27.9	49.3	16.9	14.5			40.3	30.9		w. 60 J
SW	12.1	12.9	18.0	31.5	9.3	20.4			39.0	41.1		m. 57 J
BR	16.7	31.1	34.8	60.2	22.3	13.5			27.0	28.8		m. 41 J
BJ	3.8	21.3	9.8	46.4	12.3	7.1			21.8	36.4		w. 49 J
PA	9.7	34.5	35.9	67.2	16.2	12.8			23.8	33.5		m. 62 J
WR	7.3	23.5	21.6	38.7	12.8	10.8			31.0	35.0		m. 63 J
CK	6.4	37.6					5.1	4.4	13.0	25.2	21.7	w. 28 J
HM	1.0	27.0					2.7	3.0	20.5	24.6	27.5	m. 15 J
WR	1.3	21.1					2.2	4.1	22.9	22.2	22.2	m. 73 J
WE	14.6	27.2	24.3				9.2	30.8	20.8	29.1		w. 26 J
RG	4.9	24.1	26.8				2.7	6.0	37.7	39.0		m. 28 J
SM	5.1	38.2	47.6				6.9	7.7	22.6	25.1		m. 43 J
OH	6.4	41.8	26.9				2.7	6.4	18.5	28.8		m. 28 J
												A Nr. 11

Bi/We
Nr. 25AE
Nr. 22

Pat.	Rö SR	100%	a-IgE	Ca ⁺⁺ 10 ⁻³	Ionophore 10 ⁻⁴	PL SR 10 ⁻⁵	PL 10J	PL-SR, Zentrifugation 5 min 10 min 20 min	Alter und Geschlecht	A Nr. 4
HR	6.0	26.6	38.0	63.7	20.5	6.0	58.0	7.0 14.0 24.5	m. 22 J.	
GA	13.2	25.5	32.9	63.0	23.3	9.6	72.1	9.6 16.5 22.4	w. 41 J.	
WR	7.4	30.3	34.8	47.8	13.7	8.9	26.0	14.3 28.2 26.4	m. 31 J.	
PS	3.2	34.9	46.7	69.7	10.8	3.2	68.9	8.2 66.6 39.0	w. 25 J.	
WA	6.5	26.8	33.6	61.7	9.4	8.0		5.5 20.8 33.9	m. 40 J.	
OA	10.4	18.4	45.7	64.4	6.7	10.1		6.3 15.0 18.8	m. 32 J.	
MM	8.5	25.7	23.9	53.8	8.0	4.2		5.5 15.9 18.2	w. 18 J.	
DH	9.0	31.5	32.9	42.1	9.2	5.0		7.2 17.0 38.1	m. 48 J.	AE Nr. 10

	HF m. 36 J			PH m. 64 J			SW m. 26 J			EE w. 73 J		
	His	β -GL	LDH	His	β -GL	LDH	His	β -GL	LDH	His	β -GL	LDH
RÖ	1.9	3.4	7.7	5.9	3.8	26.5	1.7	3.1	4.2	2.3	16.4	7.7
SR												
100 %	43.8	0.99	173.5	40.0	1.23	117.5	15.8	0.94	185.0	23.8	1.07	186.0
a-IgE	9.0			6.3			6.0			6.8		
RÖ	1.9	3.5	8.4	9.7	10.0	4.0	2.2	5.0	8.2	10.2	6.4	6.5
10 J												
RÖ	2.0	3.8	5.8	5.2	6.4	9.7	1.7	4.1	6.9	5.7	8.2	9.7
20 J												
PL	34.3	36.9	57.4	41.9	48.5	87.3	20.0	32.0	42.2	31.2	45.6	48.1
SR												
PL	58.9	52.6	67.2	21.5	22.5	66.6	89.1	70.0	84.3	102.4	67.6	98.2
10 J												
PL	52.4	23.0	37.4	57.3	52.0	102.2	40.0	36.2	48.8	28.6	40.6	54.2
20 J												
	RJ m. 42 J			W w. 69 J			PW m. 30 J			K m. 30 J		
	His	β -GL	LDH	His	β -GL	LDH	His	β -GL	LDH	His	β -GL	LDH
RÖ	0.8	5.6	9.6	2.3	3.8	6.9	0.6	7.7	12.1	2.2		
SR												
100 %	29.0	1.46	304.0	10.1	0.78	187.5	19.1	1.41	261.0	43.9		
a-IgE	14.1			7.2			42.1			19.7		
RÖ	1.2	5.4	11.2	3.5	53.8	7.3	1.5	7.7		2.9		
10 J												
RÖ	0.8	4.9	11.7	2.3	48.7	5.9	1.2	7.7		3.1		
20 J												
PL	79.4	75.0	82.6	19.6	19.3	19.7	34.1	29.1	43.9	15.6		
SR												
PL	86.9	65.0	88.1	73.3	64.8	73.2	42.8	25.8	43.0	21.7		
10 J												
PL	83.2	73.9	89.5	47.0	44.4	54.6	47.4	36.7	52.5	37.9		
20 J												
							Ph = Nr. 39					

LITERATURVERZEICHNIS

1. Alsins J., Claesson S., Fischer T., Juhlin L. (1975) Development of high intensity narrow-band lamps and studies of the irradiation effect on human skin. *Acta Dermatovener* 55:261-271
2. Berger D.S. (1969) Specification and design of solar ultraviolet simulators. *J Invest Dermatol* 53:192-199
3. Bork K., König W. (1981), Neue In-vitro-Methodik in der Allergologie: Histamin-Release-Test. *Dtsch med Wschr* 106:1060-1064
4. Böhm F., Meffert H., Bauer E. (1982) Sekunden-schnelle Zerstörung peripherer Lymphocyten durch 8-MOP und PUVA in vitro. *Dermatol Monatsschr* 168:667-670
5. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., (1984) *Dermatologie und Venerologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg S.865 ff.
6. Bruze M., Fregert S., Ljunggren B. (1985) Effect of ultraviolet irradiation of photopatch test substances in vitro. *Photodermatology* 2:32-37
7. Conroy M.C., Adkinson N.F., Lichtenstein L.M. (1977) Measurement of IgE on human basophils: Relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamin release. *J Immunol* 118:1317-1321
8. Conroy M. (1981) : Releasability - a new dimension in basophil and mast cell reactivity. In : J. Ring G. Burg (eds) *New Trends in Allergy*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1981, 40
9. Cripps D.J., Horowitz S., Hong R. (1978) Spectrum of ultraviolet radiation on human B and T lymphocyte viability. *Clin Exp Dermatol* 3:43-50
10. Daniels F. (1965) A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J Invest Dermatol* 44:259-263
11. Danpure H.J., Tyrrel R.M. (1975) Oxygen-dependence of near UV (365 nm) lethality and the interaction of near UV and X-rays in two mammalian cell lines. *Photochem Photobiol* 23:171-177

12. O'Dell B.L., Jenssen R.T., Becker L.E., Jackson R.T., Smith E.B. (1980) Diminished immune response in sun-damaged skin. *Arch Dermatol* 116:559-561
13. Epstein J.H. (1962) Polymorphous light eruptions. Wavelength dependency and energy studies. *Arch Dermatol* 85:122-128
14. Everett M.A., Yeagers E., Sayre R.M., Olson R.L. (1966): Penetration of epidermis by ultraviolet rays. *Photochem Photobiol* 5:533-542
15. Fielitz J., Bögl W., Stockhausen K., Kossel F. (1979) : Der Einfluß von UV- und Mikrowellenstrahlung auf biologisches Material, in: STH-Berichte (Institut für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes), Dietrich Reimer Verlag Berlin, S 16-26.
16. Fisher M.S., Kripke M.L. (1982) Suppressor T-lymphocytes control the development of primary skin cancer in ultraviolet irradiated mice. *Science* 216:1133-1134
17. Fjellner B., Hägermark Ö. (1982) Influence of ultraviolet light on itch and flare reactions in human skin induced by histamine and the histamine liberator compound 48/80. *Acta Dermatovener* 62:137-140
18. Fjellner B., Hägermark Ö. (1982) Histamine release from rat peritoneal mast cells exposed to ultraviolet light. *Acta Dermatovener* 62:215-220
19. Forbes P.D. (1986): Relative effectiveness of UVA and UVB for photocarcinogenesis in: Urbach F., Gange R.W. (eds.) *The biological effects of UVA radiation*, Praeger Publishers, New York, pp 112-121
20. Foremann J.C., Hallet M.B., Mongar J.L. (1977) The relationship between histamine secretion and ^{45}Ca -uptake by mast cells. *J Physiol* 271:193-214
21. Foreman J.C., Mongar J.L., Gomperts B.D. (1973) Calcium ionophores and the movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. *Nature* 245:249-251
22. Fredholm B., Hägermark Ö. (1970) Studies on histamine release from skin and from peritoneal mast cells of the rat induced by heat. *Acta Dermatovener* 50:273-277

23. Freeman R.G., Owens D.W., Knox J.M., Hudson H.T. (1966) Relative energy requirements for on erythral response of skin to monochromatic wavelengths of ultraviolet light present in the solar spectrum. *J Invest Dermatol* 47:586-592
24. Gange R.W., Park Y-K., Auletta M., Kagetsu N., Blacket A.D., Parrish J.A. (1986) Action spectra for cutaneous responses to ultraviolet radiation in: Urbach F., Gange R.W. (eds.) *The biological effects of UVA radiation*, Praeger Publishers, New York, pp:57-64
25. Gasparro F.P., Berger C.L., Edelson R.L. (1984) Effect of monochromatic UVA light and 8-methoxypsoralen on human lymphocyte response to mitogen. *Photodermatology* 1:10-17
26. Gast W., Haustein U.F., Biella U., Barth J., Rytter M., Haustein L., Walther Th. (1985) Zum Einfluß monochromatischer UV -Strahlung auf die Vitalität menschlicher Lymphocyten. *Dermatol Monatsschr* 171:406-408
27. Gilchrest B.A., Soter N.A., Parrish J.A., Hawk J.L., Black A.K., Hensby C.N., Greaves N.W. (1982) Longwave ultraviolet (UVA)-induced histologic and biochemical changes in normal human skin. Abstract, *J Dermatol* 78:357
28. Gilchrest B.A., Soter N.A., Stoff J.S., Mihm M.C. (1981) The human sunburn reaction : Histologic and biochemical studies. *J Am Acad Dermatol* 5:411-422
29. Goth A., Johnson A. (1973) Current concepts on the secretary function of mast cells. *Life Sciences* 16:1201-1214
30. Granerus G., Roupe G., Swanbeck G., (1981) Decreased urinary histamine metabolite after successful PUVA treatment of urticaria pigmentosa *J Invest Dermatol* 76:1-3
31. Greaves M.W., Sondergaard J., (1970) Pharmacologic agents released in ultraviolet inflammation studied by continuous skin perfusion. *J Invest Dermatol* 54:365-367.
32. Greiter F., Guttman G., Washüttl J. (1982) Die Wirkung von Sonnenstrahlung auf leistungsphysiologische, psychologische, neurophysiologische und biochemische Parameter des menschlichen Organismus *Act Dermatol* 8:71-78

33. Hawk J.M., Black A.K., Jaenicke K.F., Barr R.M., Soter N.A., Mallett A.J., Gilchrest B.A., Hensby C.N., Parrish J.A., Greaves M.W., (1983) Increased concentrations of arachidonic acid, prostaglandins E, D, and 6- oxo- Fl₂, and histamine in human skin following UVA irradiation. *J Invest Dermatol* 80:496-499
34. von der Helm D. (1984) Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten und Prostaglandin- Stoffwechsel. Inauguraldissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München.
35. Jacobelli D., Hashimoto K., Takahashi S. (1985) Effect of ultraviolet radiation on guinea pig epidermal Langerhans cell cytomembrane : Light and electron microscopic studies. *Photodermatology* 2:132-143.
36. Ishisaka K., Ishisaka T., (1967) Identification of IgE - antibodies as a carrier of reagin activity. *J Immunol* 99:1187-1198
37. Jansen C.T., (1979) The natural history of polymorphous light eruptions. *Arch Dermatol* 115:165-169
38. Kaidbey K.H., Kligman A.M., (1978) The acute effects of long-wave ultraviolet radiation on human skin. *J Invest Dermatol* 72:253-256
39. Kaidbey K., (1986) Acquired photoprotection from UVA-induced melanogenesis, in: Urbach F., Gange R. W. (eds) *The biological effects of UVA radiation*. Praeger Publishers New York, pp 175-180
40. Kavli G., Volden G., (1984) The candida test for phototoxicity. *Photodermatology* 1:204-207
41. Keahey T., Lavker R., Kaidbey K., (1981) Solar urticaria: induction of tolerance and demonstration of a photoreactive serum factor. Abstract, *J Invest Dermatol* 76:322
42. Kern F., Lichtenstein L., (1976) Defective histamine release in chronic urticaria. *J Clin Invest* 57:1369
43. Kligman A.M., Breit R., (1968) The identification of phototoxic drugs by human assay. *J Invest Dermatol* 2:90-98

44. Kligman A.M., Kaidbey K.H., (1982) Human models for identification of photosensitizing chemicals. *Journal of National Cancer Institute* 69:269-272
45. Kligman L.H., (1986) Photodamage to dermal connective tissue by UVA, in: Urbach F., Gange R.W. (eds) *The biological effects of UVA radiation*. Praeger Publishers, New York, pp 98-103
46. Knudsen E.A., (1985) The candida phototoxicity test. The sensitivity of different strains and species of candida, standardization attempts and analysis of the dose-response curves for 5- and 8-methoxypsoralen. *Photodermatology* 2:80-85
47. Kochevar I.E. (1983) Basic concepts in photobiology, in: Parrish J.A.,(ed) *Photoimmunology*. Plenum Medical Book Company, New York, pp 5-20
48. Kraemer K.H., Waters H.L., Ellingson O.L., Tarone R.E., (1979) Psoralen plus ultraviolet radiation-induced inhibition of DNA synthesis and viability in human lymphoid cells in vitro. *Photochem Photobiol* 30:263-270
49. Kraemer K.H., (1982) In vitro assay of the effects of psoralens plus ultraviolet radiation on human lymphoid cells. *Journal of National Cancer Institute* 69:219-225
50. Krüger J.P., Christophers E., Schlaak M., (1978) Dose-effects of methoxy-psoralen and UVA in cultured human lymphocytes. *Br J Dermatol* 98:141-144
51. Kumakiri M., Hashimoto K., Willis J. (1977) Biologic changes due to long-wave ultraviolet irradiation on human skin: Ultrastructural study. *J Invest Dermatol* 69:392-400
52. Lichtenstein L.M., (1975) The mechanism of basophil histamine release induced by antigen and by the calcium ionophore A 23/87. *J Immunol* 114:1692-1698
53. Lutz J. (1983) *Lysosomale Enzymfreisetzung aus neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit atopischem Ekzem*. Inaugural-Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München.
54. Malkinson F.D., (1980) The heat's on. *Arch Dermatol* 116:885-887

55. Maurer T., (1984) Ciba-Geigy Ag, Basel
Experimental contact photoallergenicity: guinea
pig models. *Photodermatology* 1:221-231
56. Maurer T., (1986) Ciba-Geigy Ag, Basel. Experi-
mentelle Modelle des photoallergischen Ekzems.
Allergologie 1:3-7
57. Morison W.L., Parrish J.A., Anderson R.R., Bloch
K.J., (1979) Sensitivity of mononuclear cells to
UV radiation. *Photochem Photobiol* 29:1045-1047
58. Morison W.L., Parrish J.A., Mc. Auliffe D.J.,
Bloch K.J. (1980) Sensitivity of mononuclear
cells to UV radiation. Effect on subsequent stimu-
lation with phytohemagglutinin.
Photochem Photobiol 33:99-101
59. Morison W.L., (1981) Photoimmunology.
J Invest Dermatol 77:71-76
60. Morison W.L., (1983) Effect of UV radiation on
immune reactions in humans, in: Parrish J.A. (ed)
Photoimmunology, Plenum Medical Book Company, New
York, pp 205-210
61. Morison W.L., (1986) The effects of UVA
radiation on immune function, in: Urbach, Gange
(eds) The biological effects of UVA radiation,
Praeger Publishers, New York, pp 202-208.
62. Mutzhas M.F., Hölzle E., Hofmann C., Plewig G.,
(1981) A new apparatus with high radiation energy
between 320-400 nm: Physical description and derma-
tological applications.
J Invest Dermatol 76:42-47
63. Mutzhas M.F., (1986) UVA-emitting light sources,
in: Urbach, Gange (eds.) The biological effects
of UVA radiation, Praeger Publishers, New York,
pp 20-23
64. Norlind K., Wennersten G., (1985) Effect of
ultraviolet radiation on the DNA synthesis of
guinea pig thymocytes cultured in vitro.
Photodermatology 2:17-119.
65. Ortel B., Tanew A., Wolff K., Hönigsmann H.,
(1986) Polymorphous light eruption : Action
spectrum and photoprotection.
J Am Acad Dermatol 14:748-753

66. OSRAM CENTRA UV-Messgerät : Für medizinische, therapeutische und technische Bestrahlungsanlagen. Gerätebeschreibung, Wirkungsweise, Bedienungsanleitung, Kalibrierung, Technische Daten.
67. Patkar S.A., Kazimierczak W., Diamant B., (1978) Histaminrelease by calcium from sodium fluoride-activated rat mast cells. Further evidence for a secretory process.
Int Archs Allergy appl Immun 57:146-154
68. Peak M., Peak J., (1986) Molecular photobiology of UVA, in : Urbach, Gange (eds.) The biological effects of UVA radiation. Praeger Publishers, New York, pp 42-49
69. Plewig G., Hofmann G., Braun-Falco O., Nath G., Kreitmair A., (1978) A new apparatus for the delivery of high intensity UVA and UVA + UVB irradiation, and some dermatological applications.
Br J Dermatol 98:15-24
70. Plewig G., Hofmann C., Hölzle E., (1979) Polymorphe Lichtdermatose, in: Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie, Hrsg. Braun-Falco O., Wolff H.H., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 117-125
71. Plewig G., Hölzle E., Roser-Maaß E., Hofmann C., (1981) Photoallergy, in: J.Ring, G. Burg (eds) New trends in allergy, pp 152-169
- 71a. Przybilla B., Brunner R., Ring J., Galosi A., Dorn M. (1984) Lichtinduziertes Arzneiexanthem. Auslösung durch Carprofen. Münch med Wschr 126:1503-1506
72. Przybilla B., Ring J., Schwab U., Dorn M., (1986) Nichtsteroidale Antirheumatika mit photosensibilisierender Wirkung. Allergologie 1:8-15
73. Ramsay C.A., Pellet F., (1986) Ultraviolet radiation and chemical requirements for experimental contact photosensitivity.
Photodermatology 3:41-45
74. Reite O.B., (1973) Effect of physical and chemical agents on the blood mast cells (basophil leucocytes) of turtles.
Acta physiol scand 87:549-556
75. Ring J., Arroyave M.C., Fritzler M.J., Tan E.M., (1978) In vitro histamine and serotonin release by radiographic contrast media. Complement dependent and independent release reaction and changes in ultrastructure of human blood cells.
Clin Exp Immunol 32:105-118

76. Ring J., (1979) Atopic dermatitis : A disease of general vasoactive mediator dysregulation. *Int Archs Allergy appl Immun* 59:233-239
77. Ring J., Arroyave C.M., (1979) Alteration of human blood cells and changes in plasma mediators produced by radiographic contrast media. *Z Immun Forsch* 155:200-211
78. Ring J., O' Connor R., (1979) In vitro histamine and serotonin release studies in atopic dermatitis *Int Archs Allergy appl Immun* 58:322-330
79. Ring J., Senter S., Cornell R.C., Arroyave C.M., Tan E.M. (1979) Plasma complement and histamine changes in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 100:521-530
80. Ring J., Allen D., Mathison D., Spiegelberg H. (1980) In vitro releasability of histamine and serotonin: Studies of atopic patients. *J Clin Lab Immunol* 3:85
81. Ring J., (1982) *Angewandte Allergologie*, MMV Medizin Verlag, München, S. 15-23
82. Ring J., (1982) Atopisches Ekzem. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 13:483-485
83. Ring J., (1983) Plasma histamine concentrations in atopic eczema. *Clinical Allergy* 13:545-552
84. Ring J., (1983) Was ist Atopie? in: O.Braun-Falco, G.Burg (Hrsg.) *Fortschritte der Dermatologie und Venerologie*, Springer Verlag, Berlin, Bd.10:103-110
85. Ring J., (1984) Reaktionsbereitschaft ("Releasability"): Veränderte Reaktionsmuster in der Freisetzung vasoaktiver Mediatoren. *Allergologie* 2:41-48
86. Ring J., (1985) Mediatoren bei allergischen Hautkrankheiten, *Allergologie* 2:69-78
87. Röhlich P., Anderson P., Uvnäs B., (1971) Electron microscope observations on compound 48/80-induced degranulation in rat mast cells. Evidence for sequential exocytosis of storage granules. *J Cell Biol* 51:465-483
88. Sachs L., (1984) *Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

89. Schauder S., Ippen H., (1982) Photodermatoses and light protection.
International Journal of Dermatology, 21:241-247
90. Scherer R., Kern B., Braun-Falco O. (1977) The human peripheral lymphocyte - a model system for studying the combined effect of psoralen plus black light. Klin Wschr 55:137-140
91. Scherer R., Kern B., Braun-Falco O. (1977) UVA-induced inhibition of proliferation of PHA-stimulated lymphocytes from humans treated with 8-methoxypsoralen. Br J Dermatol 97:519-527
92. Schmidt R., Thews G., (Hrsg.) (1977) Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 329
93. Schmoeckel C., Scherer R., Dern B., Braun-Falco O. (1978) The cytolytic effect of PUVA treatment on PHA-stimulated human peripheral lymphocytes. Acta Dermatovener 58:203-211
- 93a. Schrollhammer K., Ring J., Landthaler M., (1984) Localized heat urticaria. Abstract.
Arch Dermatol Res 277:407-408
94. Schwab U., Przybilla B., Ring J., Galosi A., Dorn M., (1985) In vitro evaluation of the phototoxic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) with photohaemolysis test (PHT) and photo-basophil-histamine-release-test (PNHRT), Abstract. Arch Dermatol Res 277:427
95. Shore P.A., Burkhalter A., Cohn Jr.V.H. (1959) A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. J Pharmacol 127:182-191
96. Siladji T., Doskoczil S., Bilek P., Greiter F. (1982) Neue Erkenntnisse zur Intensität von Ultraviolett-Strahlung (UVA,UVB) hinter Glas und Textilien. Zentralblatt für Haut- und Geschlechtskrankheiten 148:359
97. Siraganian R.P., Brodshy M.J. (1976) Automated histamine analysis for in vitro allergy testing. A method utilizing allergen-induced histamine release from whole blood.
J Allergy, Clin Immunol 57:525-540
98. Skin Photobiology (editorial), The Lancet, March 12 (1983), pp 566-568

99. Spiegel H., Plewig G., Hofmann C., Braun-Falco O. (1978) Photoaugmentation. Ein photobiologisches Phänomen. Arch Derm Res 216:189-200
100. Spikes J.D. (1983) Photosensitization in mammalian cells, in: Parrish J.A. (ed.) Photoimmunology. Plenum Medical Book Company, New York, pp 23-43
101. Stern W.K. (1972) Anatomic localization of the response to ultraviolet radiation in human skin. Dermatologica 145:361-370
102. Szentivanyi A., (1986) The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality in asthma. J Allergy 42:203-211
103. Toews G.B., Bergstresser P.R. Streilein J.W. (1980) Langerhans cells: sentinels of skin associated lymphoid tissue. J Invest Dermatol 75:78-82
104. Urbach F. (1979) Prinzipien der Lichttestung in der dermatologischen Praxis, in: Braun-Falco O., Wolff H.H. (Hrsg.) Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S 107-115
105. Urbach F. (1986) Historical aspects of UVA effects, in: Urbach F., Gange R.W. (eds.) The biological effects of UVA radiation. Praeger Publishers, New York, pp. 2-5
106. Wang R.J. (1975) Lethal effect of "daylight" fluorescent light on human cells in tissue-culture medium. Photochem Photobiol 21:373-375
107. Walz Ulrike (1985) Prostaglandine und "Releaseability". Untersuchungen zum Effekt unterschiedlich wirkender Stimuli an basophilen Leukozyten von Atopikern und Kontrollpersonen. Inaugural-Disser-tation, Ludwig Maximilians-Universität, München.
108. Weelden van, H., de Gruijl F.R., van der Leun J.C. (1986) Carcinogenesis by UVA, with an attempt to assess the carcinogenic risks of tanning with UVA and UVB, in: Urbach F., Gange R.W. (eds.) The bio-logical effect of UVA radiation. Praeger Publishers, New York, pp. 137-145
109. Weinberg E.H., Springer S.T., (1981) The evalua-tion in vitro of fragrance materials. J Soc Cosmet Chem 32:303-315

110. Willis J., Kligman A., Epstein J. (1973) Effects of long ultraviolet rays on human skin: Photoprotective or photoaugmentative?
J Invest Dermatol 59:416-420

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas der Arbeit, ebenso für die freundliche Unterstützung und Beratung während ihrer Durchführung.

Dank gebührt auch Herrn Priv. Doz. Dr. B. Przybilla für wertvolle Ratschläge bei Fragen der UVA-Bestrahlung.

Ganz besonders erwähnen möchte ich die unermüdliche Hilfsbereitschaft von Frau Franziska Sedlmeier, die eine optimale Betreuung im Labor ermöglichte.

Auch Frau Elke Luxenburger hat hierbei mitgeholfen.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Vater und meiner Schwester danken für die große Hilfe bei Reinschrift und Druck der Arbeit.

LEBENS LAUF

Name: Petra Spornraft
geb.: 15. 10. 59 in München
Adresse: Clemensstr. 72a, 8 München 40

Eltern: Vater: Herbert Spornraft, Diplom-Ingenieur
Mutter: Annemarie Spornraft, geb. Hartig,
Hausfrau

Familienstand: ledig

Schul Ausbildung: Grunds chule Garching 1966-70
Sophie-Scholl-Gymnasium 1970-71
München
Gymnasium Garching 1971-79
Abitur : 1979

Studium: Ludwig-Maximilians-Univer- 1979-85
sität München
Physikum: 1981
1. Abschnitt der Ärztlichen 1982
Prüfung
2. Abschnitt der Ärztlichen 1984
Prüfung
3. Abschnitt der Ärztlichen 1985
Prüfung

Derzeitige Tätigkeit: Seit 1.2.1986 Halbtagesstelle aus Mit-
teln des Bundesgesundheitsamtes für
eine AIDS-Kohortenstudie an der Derma-
tologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München.

